



**Susana Clara  
Ribeiro**

**Desacidificação biológica de mostos e vinhos com  
*Schizosaccharomyces pombe***

dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestrado Integrado em Engenharia Química, realizada sob a orientação científica da Dra. Ana Xavier e da Dra. Inês Portugal do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e sob orientação do Eng. Filipe Centeno da Proenol.

## o júri

### presidente

Prof. Dr. João Manuel da Costa e Araújo Pereira Coutinho  
professor associado com agregação do Departamento de Química da  
Universidade de Aveiro

Prof. Dr. José Maria Marques Oliveira  
professor auxiliar do Departamento de Engenharia Biológica da Universidade  
do Minho

Prof. Dra. Ana Maria Rebelo Barreto Xavier  
professora auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. Dra. Maria Inês Purcell de Portugal Branco  
professora auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Eng. Filipe Miguel Monteiro Centeno da Costa  
director de produção e I&D da Proenol- Indústria Biotecnológica, Lda

## **agradecimentos**

Ao finalizar este trabalho, são muitas as pessoas a quem quero agradecer por, directa ou indirectamente, me terem apoiado nesta tarefa.

À Professora Doutora Ana Maria Barreto Xavier e à Professora Doutora Maria Inês Purcell de Portugal Branco, agradeço as inextinguíveis orientações científicas que me proporcionaram como aluna de Mestrado.

À Doutora Maria de Fátima Teixeira, administradora da Proenol, por me ter proporcionado a oportunidade de realizar um estágio na Proenol que serviu de base a esta Dissertação. Ao Engenheiro Filipe Centeno, Director de Produção e I&D, agradeço a imprescindível colaboração, a disponibilidade e as sugestões que contribuíram para o meu enriquecimento científico. À Ana Silva, técnica de análises da Proenol, agradeço a imprescindível ajuda na adaptação aos métodos de trabalho utilizados na Proenol, na recolha de amostras e simpatia sempre demonstrada durante o estágio realizado na Proenol. Aos colaboradores da Proenol, especialmente do laboratório, agradeço o apoio, o carinho e a boa disposição sempre demonstrada.

À Mariana Correia e Ana Sofia Pontes, alunas de pós-graduação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, agradeço as orientações laboratoriais e as análises efectuadas no HPLC do DQ-UA.

Ao senhor António Morais, funcionário da oficina de vidro do DQ-UA, agradeço a disponibilidade sempre demonstrada na obtenção de material necessário para a montagem experimental (reactor, frasco Schott, tubos de vidro). Ao senhor Cândido Casqueira, funcionário da oficina metalomecânica do DQ-UA, agradeço a ajuda demonstrada na preparação do frasco Schott de armazenamento da solução de mosto.

Ao senhor Ivo Mateus, funcionário do Departamento de Física da Universidade de Aveiro, agradeço o apoio e a ajuda imprescindível sempre demonstrada na execução de material em teflon do reactor.

A ti Nuno, obrigado pela paciência, compreensão que tiveste, pelas palavras certas que me incentivaram em momentos mais difíceis e pela confiança sempre demonstrada.

Finalmente, agradeço aos meus amigos e à minha família em especial aos meus pais, irmã e Tia Maria, o apoio e estímulo de levar a cabo a concretização do trabalho que aqui tenho o privilégio de Vos apresentar.

## palavras-chave

Desacidificação biológica de mosto e vinho, Fermentação maloalcoólica, *Schizosaccharomyces pombe* imobilizada.

## resumo

Estudou-se a desacidificação biológica de mostos e vinhos usando leveduras *Schizosaccharomyces pombe* imobilizadas em dupla camada de alginato, [ProMalic<sup>®</sup>], com o objectivo de desenvolver um processo de desacidificação de volumes de vinho elevados em adegas, num reactor de leito fixo com reciclo. Realizaram-se ensaios laboratoriais em descontínuo para avaliar o efeito da concentração de anidrido sulfuroso, concentração inicial de ácido L-málico, temperatura e imobilização da levedura na cinética de fermentação maloalcoólica de mosto. Constatou-se que a concentração de anidrido sulfuroso, usado como anti-séptico, não afecta a cinética da fermentação e que a degradação do ácido L-málico segue uma cinética de 1ª ordem com energia de activação de  $16 \pm 2$  kcal/mol para a levedura *Schizosaccharomyces pombe* imobilizada e  $31 \pm 8$  kcal/mol para levedura livre. Realizaram-se também ensaios em descontínuo com vinho branco e diferentes concentrações de ácido L-málico, tendo-se concluído que o etanol tem um efeito inibidor da actividade da levedura.

Preparou-se e testou-se uma montagem experimental com um pequeno reactor de leito fixo, contendo *Schizosaccharomyces pombe* imobilizada [ProMalic<sup>®</sup>], com recirculação total do meio fermentativo. Neste reactor, obtêm-se velocidades de reacção superiores às obtidas nos ensaios em descontínuo, em idênticas condições, sendo possível obter o valor objectivo de 0,5 g/L de ácido L-málico em cerca de metade do tempo de reacção, embora em condições de extrema esterilidade para evitar contaminação pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

**keywords**

Biological deacidification, Maloalcoholic fermentation, Immobilized *Schizosaccharomyces pombe* into double layer alginate, Malolactic fermentation

**abstract**

The biological deacidification of musts and wine using *Schizosaccharomyces pombe* yeasts immobilized in double layer alginate beads [ProMalic<sup>®</sup>] was studied. The aim was the development of a fixed bed recycle reactor for the deacidification of high volumes of wine at wine cellars. Batch laboratory tests were performed to evaluate the effect of sulphurous anhydride, L-malic acid initial concentration, temperature and yeast immobilization on the must's maloalcoholic fermentation kinetics. Results show that the concentration of sulphurous anhydride, used as an antiseptic, doesn't affect the deacidification rate, that the degradation of L-malic acid follows a first order reaction with an activation's energy of  $16 \pm 2$  kcal/mol for immobilized *Schizosaccharomyces pombe* and  $31 \pm 8$  kcal / mol for the free yeast. Batch tests were also performed with white wine and different concentrations of L-malic acid to reveal the inhibitory effect of ethanol on the yeast's activity.

A small fixed-bed recycle reactor containing immobilized *Schizosaccharomyces pombe* [ProMalic<sup>®</sup>] was prepared and tested. Reaction rates are higher in this reactor when compared with batch tests in similar conditions. The objective value of 0.5 g/L of L-malic acid is attainable in about half the time but conditions of extreme sterility are required to prevent contamination with *Saccharomyces cerevisiae*.



A - Factor pré exponencial

[ácido L-málico] - concentração de ácido L-málico (g/L)

[açúcares] - concentração de glucose e frutose (g/L)

A<sub>T</sub> – acidez total (g/L ácido tartárico)

ADP – adenosina difosfato

ATP – adenosina trifosfato

C<sub>A</sub> - concentração de substrato (mol/dm<sup>3</sup>)

C<sub>A0</sub> - concentração inicial de substrato (mol/dm<sup>3</sup>)

CO<sub>2</sub> – molécula de dióxido de carbono

D - taxa de diluição (min<sup>-1</sup>)

D<sub>esf</sub>- diâmetro das esferas de ProMalic<sup>®</sup> re-hidratadas (cm)

D<sub>int</sub>- diâmetro interno do fermentador (cm)

[etanol] - concentração de etanol (g/L)

E<sub>a</sub> - energia de activação (Kcal /mol)

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

F<sub>A</sub> - fluxo molar à entrada (mol/s)

F<sub>A0</sub> - fluxo molar de ácido L-málico (mol/s)

FA – fermentação alcoólica

FMA - fermentação maloalcoólica

FML - fermentação maloláctica

F-6-P - frutose-6-fosfato

G-6-P - glucose-6-fosfato

G6P-DH - glucose-6-fosfato desidrogenase

GOT - glutamato-oxaloacetato-transaminase

h<sub>leito</sub> - altura do leito (cm)

H<sub>2</sub> – molécula de hidrogénio

H<sub>2</sub>O – molécula de água

HI - ácido iodídrico

H<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> – ácido sulfuroso

HSO<sub>3</sub><sup>-</sup> – ião bissulfito

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – ácido sulfúrico

HK – hexocinase

$I_2$  - molécula de iodo  
IC – intervalo de confiança  
k - constante cinética ( $\text{dia}^{-1}$ )  
 $k_{ms}$  - coeficiente de transferência de massa externa (m/s)  
 $K_s$  - constante de Monod (g/L)  
 $K_2S_2O_5$ - metabissulfito de potássio  
L-MDH - L-malato desidrogenase  
mEq/L - miliequivalente por litro  
 $m_{\text{ProMalic}}$  - massa das esferas de ProMalic (g)  
M – molaridade da solução  
 $Mn^{2+}$  - ião manganésio  
N – normalidade da solução de iodo (N)  
N - número de graus de liberdade  
 $N_1$  – normalidade da solução de hidróxido de sódio (N)  
NaOH - hidróxido de sódio  
 $N_A$  – número de moles de substrato (mol)  
 $N_{AZ}$  - velocidade de difusão ( $\text{mol}/m_{\text{cat}}^2 \cdot s$ )  
 $N_S$  - fluxo de substrato ( $\text{mol}/m^2 s$ )  
NAD - nicotinamida–adenina–dinucleotídeo  
NADH – nicotinamida–adenina–dinucleotídeo reduzido  
NADP – nicotinamida–adenina–dinucleotídeo–fosfato  
NADPH – nicotinamida–adenina–dinucleotídeo–fosfato reduzido  
 $O_2$  – molécula de oxigénio  
 $P_i$  - fosfato inorgânico  
PGI – enzima fosfoglucoase isomerase  
Q - caudal de recirculação do meio fermentativo ( $\text{cm}^3/\text{min}$ )  
rpm - rotações por minuto  
 $r_0$  - velocidade de consumo de ácido L-málico (g/L dia)  
 $r_A$  - velocidade de reacção do substrato (g/L.dia)  
 $r_{Av}$  - velocidade de reacção por unidade de volume (g/L dia)  
 $r_{Aw}$  - velocidade de reacção por massa de catalisador ( $\text{g}/g_{\text{cat}} \text{dia}$ )  
R – constante dos gases perfeitos



s - desvio padrão

S – concentração de substrato (g/L)

S<sub>f</sub> – concentração de substrato na fase líquida (g/L)

S<sub>s</sub> - concentração de substrato à superfície do catalisador (g/L)

SO<sub>2</sub> – anidrido sulfuroso molecular

SO<sub>3</sub> – trióxido de enxofre

SO<sub>3</sub><sup>2-</sup> – ião sulfito

SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> – ião sulfato

[SO<sub>2</sub>]<sub>livre</sub> - concentração de anidrido sulfuroso na forma livre (mg/L)

[SO<sub>2</sub>]<sub>total</sub> - concentração de anidrido sulfuroso total (mg/L)

t - tempo (dia)

T - temperatura (°C ou K)

t- t-student

V – volume de solução de iodo gasto na titulação (mL)

V<sub>1</sub> – volume de solução de iodo gasto na 1ª titulação (mL)

V<sub>2</sub> – volume de solução de iodo gasto na 2ª titulação (mL)

V<sub>3</sub> – volume de solução de iodo gasto na 3ª titulação (mL)

V<sub>a</sub> – volume da amostra de mosto (mL)

V<sub>p</sub> - volume da esfera de ProMalic (cm<sup>3</sup>)

V<sub>reactor</sub> - volume do reactor (cm<sup>3</sup>)

V<sub>t</sub> – volume de hidróxido de sódio gasto (mL)

W<sub>cat</sub> - massa de catalisador (g)

$\bar{x}$  – média do número de amostras

μ - viscosidade do mosto (g/cm min)

μ - velocidade específica de crescimento (h<sup>-1</sup>)

μ<sub>m</sub> - velocidade máxima específica de crescimento (h<sup>-1</sup>)

τ - tempo de residência (s; min)

ρ - densidade do mosto (g/cm<sup>3</sup>)

ρ<sub>esf</sub> - densidade das esferas de ProMalic (g/cm<sup>3</sup>)



<b>Introdução .....</b>	<b>1</b>
<b>Capítulo I: Revisão Bibliográfica .....</b>	<b>3</b>
1. Vinho: História, Produção, Fermentação e Composição .....	4
1.1. A História do vinho .....	4
1.2. Processo de produção do vinho (Vinificação) .....	4
1.2.1. Adição do anidrido sulfuroso durante o processo de vinificação .....	8
1.3. Processo de fermentação do vinho .....	10
1.3.1. Fermentação alcoólica (FA) .....	10
1.3.2. Fermentação maloláctica (FML) .....	11
1.4. Composição do vinho .....	14
2. Desacidificação de mostos e vinhos .....	15
2.1. Fermentação maloalcoólica (FMA) .....	17
3. Levedura <i>Schizosaccharomyces pombe</i> .....	18
4. Fermentadores .....	22
 <b>Capítulo II: Material e Métodos.....</b>	<b>25</b>
1. Levedura.....	26
2. Preparação e caracterização da solução de mosto .....	26
2.1. Determinação da massa específica e viscosidade da solução de mosto diluído ....	27
3. Fermentação em descontínuo .....	27
4. Fermentador de leito fixo com reciclo total .....	28
4.1. Montagem e funcionamento do fermentador.....	28
4.2. Esterilização do material.....	29
4.3. Funcionamento .....	30
5. Determinação da concentração de ácido L-málico e de açúcares .....	30
5.1. Determinação da concentração de ácido L-málico .....	30
5.2. Determinação da concentração de açúcares .....	30
6. Determinação da concentração de anidrido sulfuroso livre e total.....	31
6.1. Método de Ripper simples .....	31
6.2. Método de Ripper duplo .....	33
6.3. Teste da reprodutibilidade do método de Ripper simples e duplo .....	34

7. Determinação da acidez total .....	35
<b>Capítulo III: Resultados e discussão .....</b>	<b>37</b>
1. Comprovação da ocorrência da fermentação maloalcoólica.....	38
2. Influência de diferentes factores no processo de desacidificação descontínuo de mosto .....	39
2.1. Anidrido sulfuroso .....	39
2.2. Ácido L-málico .....	42
2.3. Etanol .....	44
2.4. Temperatura.....	46
2.4.1. <i>Schizosaccharomyces pombe</i> imobilizada.....	46
2.4.2. <i>Schizosaccharomyces pombe</i> livre.....	48
3. Energia de activação do processo de desacidificação.....	50
4. Desacidificação de mosto num fermentador de leito fixo com reciclo total.....	52
4.1. Análises efectuadas à concentração de etanol utilizando a técnica de HPLC.....	53
4.2. Ácido L-málico .....	54
4.3. Carga de ProMalic® .....	57
4.4. Caudal de recirculação .....	60
4.5. Interação entre as leveduras <i>Schizosaccharomyces pombe</i> e <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	61
<b>Capítulo IV: Conclusões/Sugestões para Trabalho Futuro .....</b>	<b>65</b>
<b>Capítulo V: Bibliografia .....</b>	<b>69</b>
<b>Capítulo VI: Anexos .....</b>	<b>75</b>
Anexo A - Propriedades do fermentador, do ProMalic® e da solução de mosto .....	76
Anexo B - Teste de reprodutibilidade dos métodos de Ripper simples e duplo. ....	76

Anexo C - Ensaio para avaliar a influência do anidrido sulfuroso no processo de desacidificação realizado em <i>batch</i> . ....	77
Anexo D - Ensaio para avaliar a influência da concentração inicial do ácido L-málico no processo de desacidificação realizado em <i>batch</i> .....	80
Anexo E - Ensaio para avaliar a influência do etanol no processo de desacidificação realizado em <i>batch</i> .....	84
Anexo F - Ensaio para avaliar a influência da temperatura no processo de desacidificação realizado em <i>batch</i> .....	87
Anexo G - Influência da concentração inicial de ácido L-málico no processo de desacidificação num fermentador de leito fixo com reciclo total.....	93
Anexo H - Influência da carga de ProMalic <sup>®</sup> no processo de desacidificação num fermentador de leito fixo com reciclo total. ....	98
Anexo I - Influência do caudal de recirculação no processo de desacidificação num fermentador de leito fixo com reciclo total .....	106
Anexo J - Influência da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> no processo de desacidificação num fermentador de leito fixo com reciclo total.....	109

**Índice de Tabelas**

<b>Tabela 1</b> - Quantidades máximas de anidrido sulfuroso total (mg/L) na legislação portuguesa e europeia.....	9
<b>Tabela 2</b> - Composição química típica do vinho Branco e Tinto .....	14
<b>Tabela 3</b> - Valores médios iniciais e finais de pH, concentração de ácido L-málico, acidez total e concentração de anidrido sulfuroso na forma livre e total e primeiro dia de observação de turvação do meio para os ensaios em que se estudou o efeito da concentração de anidrido sulfuroso livre no mosto .....	41
<b>Tabela 4</b> - Valores médios da velocidade de consumo de ácido L-málico e respectivo coeficiente de correlação para os ensaios em que se estudou o efeito da concentração inicial de anidrido sulfuroso livre no mosto.....	41
<b>Tabela 5</b> - Valores médios iniciais e finais de pH, concentração de ácido L-málico e acidez total, velocidade de consumo de ácido L-málico e primeiro dia em que se observou turvação do meio para os ensaios realizados com mosto em que se estudou o efeito da concentração inicial de ácido L-málico.....	43
<b>Tabela 6</b> - Valores médios iniciais e finais de pH, concentração de ácido L-málico, açúcares, acidez total, velocidade de consumo de ácido L-málico e respectivo primeiro dia em que se observou turvação do meio, para os ensaios realizados com vinho em que se estudou o efeito do etanol.....	46
<b>Tabela 7</b> - Valores médios iniciais finais de pH, concentração de ácido L-málico, acidez total, velocidade de consumo de ácido L-málico e primeiro dia em que se observou turvação do meio para os ensaios realizados com mosto em que se estudou o efeito da temperatura.....	47
<b>Tabela 8</b> - Valores médios iniciais e finais de pH, concentração de ácido L-málico, acidez total e velocidade de consumo de ácido L-málico em que se estudou o efeito da temperatura na desacidificação de mosto pela levedura <i>Schizosaccharomyces pombe</i> na forma livre .....	49

**Tabela 9** - Valores da constante cinética, energia de activação e respectivo coeficiente de correlação para as temperaturas de 22, 20, 18, 15 e 10°C para o ensaio realizado com mosto e levedura *Schizosaccharomyces pombe* imobilizada e livre .....52

**Tabela 10** - Valores médios iniciais e finais de pH, concentração de ácido L-málico, acidez total e velocidade de consumo de ácido L-málico no ensaio realizado com mosto em que se estudou o efeito da concentração inicial de ácido L-málico.....56

**Tabela 11** - Valores iniciais e finais de pH, concentração de ácido L-málico, acidez total e velocidade de consumo de ácido L-málico no ensaio realizado com mosto em que se estudou o efeito da carga de ProMalic<sup>®</sup> no fermentador de leito fixo com reciclo total .....58

**Tabela 12** - Valores de caudal de recirculação, altura do leito, tempo de residência e taxa de diluição para o ensaio com cargas de 2, 5 e 10 g/L de ProMalic<sup>®</sup> .....59

**Tabela 13** - Valores iniciais e finais de pH, concentração de ácido L-málico, acidez total e velocidade consumo de ácido L-málico no ensaio realizado com mosto em que se estudou o efeito do caudal de recirculação no processo de desacidificação do mosto.....61

**Tabela 14** - Valores da altura do leito, do tempo de residência e taxa de diluição para o ensaio realizado com mosto e um caudal de 257 mL/min .....61

**Tabela 15** - Valores iniciais e finais de pH, concentração de ácido L-málico, acidez total e velocidade de consumo de ácido L-málico no ensaio em que se estudou o efeito da *Saccharomyces cerevisiae* no processo de desacidificação do mosto levada a cabo pelo ProMalic<sup>®</sup> .....63

**Tabela A.1** - Diâmetro interno do fermentador.....76

**Tabela A.2** - Diâmetro e densidade das esferas de ProMalic<sup>®</sup> re-hidratadas.....76

**Tabela A.3** - Massa específica e da densidade da solução de mosto .....76

**Tabela B.1** - Concentração de anidrido sulfuroso na forma livre e total para o método de Ripper simples e método de Ripper duplo com respectiva média, desvio padrão e intervalo de confiança .....76

**Tabela C.1** - Volume adicionado de solução de anidrido sulfuroso a 6% no início do ensaio a diferentes concentrações de anidrido sulfuroso. ....77

<b>Tabela C.2</b> - Concentração de anidrido sulfuroso na forma livre presente no mosto após várias adições da solução de anidrido sulfuroso.....	77
<b>Tabela C.3</b> - Concentração de ácido L-málico ao longo do processo de desacidificação a 15°C para as diferentes concentrações de anidrido sulfuroso livre .....	77
<b>Tabela C.4</b> - Concentração de açúcares ao longo do processo de desacidificação a 15°C para as diferentes concentrações de anidrido sulfuroso livre .....	78
<b>Tabela D.1</b> - Concentração de anidrido sulfuroso no início do ensaio a diferentes concentrações de ácido L-málico a 15°C .....	80
<b>Tabela D.2</b> - Concentração de ácido L-málico ao longo do processo de desacidificação a 15°C para diferentes concentrações iniciais de ácido L-málico .....	81
<b>Tabela D.3</b> - Concentração de açúcares ao longo do processo de desacidificação a 15°C para diferentes concentrações iniciais de ácido L-málico .....	82
<b>Tabela D.4</b> - Concentração de anidrido sulfuroso na forma livre e total no final do ensaio com diferentes concentrações de ácido L-málico a 15°C.....	84
<b>Tabela E.1</b> - Concentração de anidrido sulfuroso no início do ensaio realizado para avaliar o efeito do etanol no processo de desacidificação.....	84
<b>Tabela E.2</b> - Concentração de ácido L-málico ao longo do processo de desacidificação a 15°C e 20°C para estudar o efeito do etanol.....	84
<b>Tabela E.3</b> - Concentração de anidrido sulfuroso na forma livre e total no final do ensaio realizado para avaliar o efeito do etanol com diferentes concentrações de ácido L-málico e temperaturas .....	86
<b>Tabela F.1</b> - Concentração inicial de anidrido sulfuroso presente em cada um dos ensaios a diferentes temperaturas utilizando o ProMalic® .....	87
<b>Tabela F.2</b> - Concentração de ácido L-málico ao longo do processo de desacidificação utilizando a levedura <i>Schizosaccharomyces pombe</i> imobilizada para estudar o efeito da temperatura.....	87
<b>Tabela F.3</b> - Concentração de açúcares ao longo do processo de desacidificação utilizando a levedura <i>Schizosaccharomyces pombe</i> imobilizada para estudar o efeito da temperatura. ....	88



**Tabela F.4** - Registo da concentração de anidrido sulfuroso no final do ensaio realizado a diferentes temperaturas utilizando a levedura *Schizosaccharomyces pombe* imobilizada em dupla camada de alginato .....91

**Tabela F.5** - Concentração inicial de anidrido sulfuroso presente em cada um dos ensaios realizado a diferentes temperaturas utilizando a levedura *Schizosaccharomyces pombe* livre .....91

**Tabela F.6** - Concentração de ácido L-málico ao longo do processo de desacidificação utilizando a levedura *Schizosaccharomyces pombe* livre para estudar o efeito da temperatura.....91

**Tabela F.7** - Concentração de açúcares ao longo do processo de desacidificação utilizando a levedura *Schizosaccharomyces pombe* imobilizada para estudar o efeito da temperatura.....92

**Tabela F.8** - Concentração final de anidrido sulfuroso presente em cada um dos ensaios realizado a diferentes temperaturas com a levedura *Schizosaccharomyces pombe* livre .....93

**Tabela G.1** - Concentração de anidrido sulfuroso no início do ensaio realizado num fermentador de leito fixo com reciclo total com diferentes concentrações de ácido L-málico a 15°C.....93

**Tabela G.2** - Concentração de ácido L-málico ao longo do processo de desacidificação num fermentador de leito fixo com reciclo total a 15°C para estudar o efeito da concentração inicial de ácido L-málico .....94

**Tabela G.3** - Concentração de açúcares ao longo do processo de desacidificação num fermentador de leito fixo com reciclo total a 15°C para estudar o efeito da temperatura .....94

**Tabela G.4** - Concentração de anidrido sulfuroso no final do ensaio realizado com diferentes concentrações de ácido L-málico a 15°C .....98

**Tabela H.1** - Concentração de anidrido sulfuroso no início do ensaio realizado com diferentes cargas de ProMalic<sup>®</sup> a 15°C .....98

**Tabela H.2** - Concentração de ácido L-málico ao longo do processo de desacidificação num fermentador de leito fixo com reciclo total a 15°C para estudar o efeito da concentração de ProMalic® ..... 99

**Tabela H.3** - Concentração de açúcares ao longo do processo de desacidificação num fermentador de leito fixo com reciclo a 15°C para estudar o efeito da carga de ProMalic® ..... 100

**Tabela H.4** - Concentração de anidrido sulfuroso no final do ensaio realizado com diferentes cargas de ProMalic® a 15°C ..... 105

**Tabela I.1** - Concentração de anidrido sulfuroso no início do ensaio realizado com um caudal de 257 cm<sup>3</sup>/min a 15°C ..... 106

**Tabela I.2** - Concentração de ácido L-málico ao longo do processo de desacidificação num fermentador de leito fixo com reciclo total a 15°C para estudar o efeito do caudal ..... 106

**Tabela I.3** - Concentração de açúcares ao longo do processo de desacidificação num fermentador de leito fixo com reciclo total a 15°C para estudar o efeito do caudal. .... 106

**Tabela I.4** - Concentração de anidrido sulfuroso no final do ensaio realizado com um caudal de 257cm<sup>3</sup>/min a 15°C ..... 108

**Tabela J.1** - Concentração de anidrido sulfuroso no início do ensaio realizado para avaliar a influência da *Saccharomyces cerevisiae* no processo de desacidificação realizado pela levedura *Schizosaccharomyces pombe* imobilizada a 15°C ..... 109

**Tabela J.2** - Concentração de ácido L-málico ao longo do processo de desacidificação num fermentador de leito fixo com reciclo total a 15°C para estudar o efeito da presença da levedura *Saccharomyces cerevisiae* ..... 109

**Tabela J.3** - Concentração de anidrido sulfuroso no final do ensaio realizado para avaliar a influência da *Saccharomyces cerevisiae* no processo de desacidificação realizado pela levedura *Schizosaccharomyces pombe* imobilizada a 15°C ..... 110

## Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> - Esquema das várias etapas na produção de vinho Branco e Tinto.....	6
<b>Figura 2</b> - Esquema das diferentes formas do anidrido sulfuroso no vinho .....	9
<b>Figura 3</b> - Imagem da levedura <i>Saccharomyces</i> .....	10
<b>Figura 4</b> - Imagem da bactéria láctica do género <i>Leuconostoc</i> .....	12
<b>Figura 5</b> – Esquema das três vias possíveis para a metabolização do ácido L-málico por bactérias lácticas .....	13
<b>Figura 6</b> - Estrutura química dos ácidos tartárico (a), málico (b) e láctico (c) .....	15
<b>Figura 7</b> - Mecanismos em estudo para a fermentação maloalcoólica .....	17
<b>Figura 8</b> - Esquema do processo de fermentação maloalcoólica .....	17
<b>Figura 9</b> - Imagem da levedura <i>Schizosaccharomyces pombe</i> .....	19
<b>Figura 10</b> – Esquema da utilização da levedura <i>Schizosaccharomyces pombe</i> imobilizada em dupla camada de alginato em adegas .....	21
<b>Figura 11</b> - Variação da velocidade específica de crescimento em função da concentração de substrato segundo a equação de Monod.....	23
<b>Figura 12</b> - Interacção do processo de transferência de massa e reacção numa partícula de biocatalisador imobilizado .....	24
<b>Figura 13</b> - Esquema e fotografia da montagem experimental .....	29
<b>Figura 14</b> - Comparação da concentração de anidrido sulfuroso na forma livre (a) e total (b) para o método Ripper simples e para o método de Ripper duplo e respectivos intervalos de confiança.....	34
<b>Figura 15</b> - Evolução inicial das concentrações de ácido L-málico, etanol e de açúcares ao longo do processo de fermentação de mosto com ProMalic <sup>®</sup> .....	39
<b>Figura 16</b> - Perfis de concentração de ácido L-málico (a) e de açúcares (b) ao longo do processo de desacidificação do mosto realizado pelo ProMalic <sup>®</sup> com uma carga de 1 g/L a 15°C para avaliar o efeito da concentração de anidrido sulfuroso livre .....	40

<b>Figura 17</b> - Perfis de concentração de ácido L-málico (a) e de açúcares (b) para avaliar o efeito da concentração inicial de ácido L-málico no processo de desacidificação do mosto realizado pelo ProMalic® com uma carga de 1 g/L a 15°C.....	42
<b>Figura 18</b> - Evolução da velocidade de consumo de ácido L-málico em função da sua concentração .....	43
<b>Figura 19</b> - Perfis de concentração de ácido L-málico ao longo do processo de desacidificação de vinho realizado pelo ProMalic® com uma carga de 1 g/L em que se estudou o efeito do etanol variando a concentração de ácido L-málico e a temperatura (2 g/L de ácido L-málico a 15°C.....	44
<b>Figura 20</b> - Perfis de concentração de ácido L-málico ao longo do processo de desacidificação de mosto (a) e de vinho (b) realizado pelo ProMalic® com uma carga de 1 g/L a 15°C (2 g/L de ácido L-málico .....	45
<b>Figura 21</b> - Perfis de concentração de ácido L-málico ao longo do processo de desacidificação de mosto (a) e de vinho (b) realizado pelo ProMalic® com uma carga de 1 g/L e uma concentração inicial de ácido L-málico de 5 g/L a 15°C e 20°C.....	45
<b>Figura 22</b> - Perfis de concentração de ácido L-málico (a) e de açúcares (b) ao longo do processo de desacidificação de mosto realizado pelo ProMalic® com uma carga de 1 g/L a diferentes temperaturas.....	47
<b>Figura 23</b> - Evolução da velocidade de consumo de ácido L-málico pela levedura <i>Schizosaccharomyces pombe</i> e o dia (valor médio) em que se observou o aparecimento de turvação do meio em função da temperatura.....	48
<b>Figura 24</b> - Perfis de concentração de ácido L-málico (a) e de açúcares (b) ao longo do processo de desacidificação de mosto realizado pela levedura <i>Schizosaccharomyces pombe</i> na forma livre a diferentes temperaturas.....	49
<b>Figura 25</b> - Evolução velocidade de degradação de ácido L-málico em função da temperatura no processo de desacidificação de mosto realizado pela levedura <i>Schizosaccharomyces pombe</i> na forma livre e na forma imobilizada .....	50
<b>Figura 26</b> - Perfis de concentração de ácido L-málico e linhas representativas de um ajuste exponencial de primeira ordem determinar a constante cinética do processo para a levedura <i>Schizosaccharomyces pombe</i> imobilizada (a) e na forma livre (b).....	51

**Figura 27** - Perfis de concentração de ácido L-málico, etanol e de açúcares ao longo do processo de fermentação maloalcoólica de mosto no fermentador de leito fixo com reciclo total .....53

**Figura 28** - Evolução da concentração de ácido L-málico no processo de desacidificação de mosto pelo ProMalic<sup>®</sup> com uma carga de 1 g/L num fermentador de leito fixo com reciclo total com uma concentração inicial de ácido L-málico de 2 g/L (a) e 5 g/L (b) e um caudal de recirculação de aproximadamente 100 mL /min a 15°C .....54

**Figura 29** - Perfis de concentração de açúcares ao longo do processo de desacidificação de mosto no fermentador de leito fixo com reciclo total realizado, com uma concentração inicial de ácido L-málico de 2 g/L (a) e 5 g/L (b) com um caudal de 100 mL /min e uma carga de 1 g/L de ProMalic<sup>®</sup> a 15°C .....55

**Figura 30** - Perfis de concentração de ácido L-málico ao longo do processo de desacidificação de mosto levada a cabo pelo ProMalic<sup>®</sup> (com uma carga de 1 g/L) com uma concentração inicial de ácido L-málico de 2 g/L e 5 g/L e um caudal de recirculação na ordem de 100 mL /min a 15°C .....56

**Figura 31** - Comparação das curvas de consumo de ácido L-málico no processo de desacidificação de mosto no fermentador de leito fixo com reciclo total e em *batch* a 15°C com uma concentração inicial de ácido L-málico de 2 g/L (a) e 5 g/L de ácido L-málico (b) .....57

**Figura 32** - Perfis de concentração de ácido L-málico (a) e de açúcares (b) no processo de desacidificação de mosto no fermentador de leito fixo com reciclo total a 15°C para diferentes cargas de ProMalic<sup>®</sup> .....58

**Figura 33** - Variação da velocidade de consumo de ácido L-málico em função da carga de ProMalic<sup>®</sup> a 15°C no fermentador de leito fixo com reciclo total .....59

**Figura 34** - Perfis de concentração de ácido L-málico (a) e de açúcares (b) no processo de desacidificação de mosto no fermentador de leito fixo com reciclo total a 15°C com carga de ProMalic<sup>®</sup> 1 g/L e um caudal na ordem de 100 mL/min e 257 mL/min .....60

**Figura 35** - Perfis de concentração de ácido L-málico e de açúcares no fermentador de leito fixo com reciclo total a 15°C com 1g/L de ProMalic<sup>®</sup> em que se estudou o efeito da

presença da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> no processo de desacidificação do mosto .....	62
--	----

<b>Figura 36</b> - Perfis de concentração de ácido L-málico ao longo do processo de desacidificação do mosto no fermentador de leito fixo com reciclo total a 15°C realizado com ProMalic® e com ProMalic® em interacção com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	63
--	----

<b>Figura C.1</b> - Perfil de concentração de ácido L-málico ao longo do tempo para o ensaio com uma concentração inicial de 0 mg/L de anidrido sulfuroso a 15°C.....	79
---	----

<b>Figura C.2</b> - Perfil de concentração de ácido L-málico ao longo do tempo para o ensaio com uma concentração inicial de 15 mg/L de anidrido sulfuroso a 15°C .....	79
---	----

<b>Figura C.3</b> - Perfil de concentração de ácido L-málico ao longo do tempo para o ensaio com uma concentração inicial de 30 mg/L de anidrido sulfuroso a 15°C.....	80
--	----

<b>Figura C.4</b> - Perfil de concentração de ácido L-málico ao longo do tempo para o ensaio com uma concentração inicial de 40 mg/L de anidrido sulfuroso a 15°C.....	80
--	----

<b>Figura D.1</b> - Perfil de concentração de ácido L-málico ao longo do tempo para o ensaio com uma concentração inicial 2 g/L de ácido L-málico a 15°C. ....	83
--	----

<b>Figura D.2</b> - Perfil de concentração de ácido L-málico ao longo do tempo para o ensaio com uma concentração inicial 5 g/L de ácido L-málico a 15°C .....	83
--	----

<b>Figura D.3</b> - Perfil de concentração de ácido L-málico ao longo do tempo para o ensaio com uma concentração inicial 8 g/L de ácido L-málico a 15°C. ....	83
--	----

<b>Figura E.1</b> - Perfil de concentração de ácido L-málico ao longo do tempo para o ensaio realizado com uma concentração inicial de 2 g/L a 15 e 20°C e respectiva linearização .....	85
--	----

<b>Figura E.2</b> - Perfil de concentração de ácido L-málico ao longo do tempo para o ensaio realizado com uma concentração inicial de 5 g/L a 15 e 20°C e respectiva linearização .....	86
--	----

<b>Figura E.3</b> - Perfil de concentração de ácido L-málico ao longo do tempo para o ensaio realizado com uma concentração inicial de 8 g/L a 15°C e respectiva linearização	86
---	----

<b>Figura F.1</b> - Perfil de concentração de ácido L-málico ao longo do tempo e respectiva linearização a 10°C para o ProMalic® .....	89
<b>Figura F.2</b> - Perfil de concentração de ácido L-málico ao longo do tempo e respectiva linearização a 15°C para o ProMalic® .....	89
<b>Figura F.3</b> - Perfil de concentração de ácido L-málico ao longo do tempo e respectiva linearização a 18°C para o ProMalic® .....	90
<b>Figura F.4</b> - Perfil de concentração de ácido L-málico ao longo do tempo e respectiva linearização a 20°C para o ProMalic® .....	90
<b>Figura F.5</b> - Perfil de concentração de ácido L-málico ao longo do tempo e respectiva linearização a 22°C para o ProMalic® .....	90
<b>Figura F.6</b> - Perfil de concentração de ácido L-málico ao longo do tempo e respectiva linearização a 10°C para a levedura <i>Schizosaccharomyces pombe</i> na forma livre. ....	92
<b>Figura F.7</b> - Perfil de concentração de ácido L-málico ao longo do tempo e respectiva linearização a 15°C para a levedura <i>Schizosaccharomyces pombe</i> na forma livre. ....	92
<b>Figura F.8</b> - Perfil de concentração de ácido L-málico ao longo do tempo e respectiva linearização a 20°C para a levedura <i>Schizosaccharomyces pombe</i> na forma livre. ....	93
<b>Figura G.1</b> - Perfil de concentração de ácido L-málico no fermentador de leito fixo com reciclo total ao longo do tempo e respectiva linearização para o ensaio com uma concentração inicial de ácido L-málico de 2 g/L a 15°C .....	95
<b>Figura G.2</b> - Perfil de concentração de ácido L-málico no fermentador de leito fixo com reciclo total ao longo do tempo e respectiva linearização para o ensaio com uma concentração inicial de ácido L-málico de 5 g/L a 15°C .....	95
<b>Figura G.3</b> - Variação da acidez total no fermentador de leito fixo com reciclo total ao longo do tempo para o ensaio com uma concentração inicial de ácido L-málico de 2 g/L a 15°C. ....	95

**Figura G.4** - Variação da acidez total no fermentador de leito fixo com reciclo total ao longo do tempo para o ensaio com uma concentração inicial de ácido L-málico de 5 g/L a 15°C.....96

**Figura G.5** - Variação do pH no fermentador de leito fixo com reciclo total ao longo do tempo para o ensaio com uma concentração inicial de ácido L-málico de 2 g/L a 15°C. ....96

**Figura G.6** - Variação do pH no fermentador de leito fixo com reciclo total ao longo do tempo para o ensaio com uma concentração inicial de ácido L-málico de 5 g/L a 15°C96

**Figura G.7** - Variação da absorvância a 400 nm no fermentador de leito fixo com reciclo total ao longo do tempo para o ensaio com uma concentração inicial de ácido L-málico de 2 g/L a 15°C.....97

**Figura G.8** - Variação da absorvância a 400 nm no fermentador de leito fixo com reciclo total ao longo do tempo para o ensaio com uma concentração inicial de ácido L-málico de 5 g/L a 15°C.....97

**Figura G.9** - Variação da absorvância a 620 nm no fermentador de leito fixo com reciclo ao longo do tempo para o ensaio com uma concentração inicial de ácido L-málico de 2 g/L a 15°C .....97

**Figura G.10** - Variação da absorvância a 620 nm no reactor ao longo do tempo para o ensaio com uma concentração inicial de ácido L-málico de 5 g/L a 15°C.....98

**Figura H.1** - Evolução do consumo do ácido L-málico no fermentador a 15°C com concentração inicial de 5 g/L de ácido L-málico e carga de ProMalic® 5 g/L (a) 10 g/L (b) .....99

**Figura H.2** - Perfil de concentração de ácido L-málico no fermentador de leito fixo com reciclo total ao longo do tempo e respectiva linearização para uma carga de 2 g/L de ProMalic® a 15°C ..... 100

**Figura H.3** - Perfil de concentração de ácido L-málico no fermentador de leito fixo com reciclo total ao longo do tempo e respectiva linearização para uma carga de 5 g/L de ProMalic® a 15°C..... 101



<b>Figura H.4</b> - Perfil de concentração de ácido L-málico no fermentador de leite fixo com reciclo total ao longo do tempo e respectiva linearização para uma carga de 10 g/L de ProMalic <sup>®</sup> a 15°C.....	101
<b>Figura H.5</b> - Variação da acidez total no fermentador de leite fixo com reciclo total ao longo do tempo para uma carga de 2 g/L de ProMalic <sup>®</sup> a 15°C. ....	101
<b>Figura H.6</b> – Variação da acidez total no fermentador de leite fixo com reciclo total ao longo do tempo para uma carga de 5 g/L de ProMalic <sup>®</sup> a 15°C. ....	102
<b>Figura H.7</b> - Variação da acidez total no fermentador de leite fixo com reciclo total ao longo do tempo para uma carga de 10 g/L de ProMalic <sup>®</sup> a 15°C. ....	102
<b>Figura H.8</b> - Variação do pH no fermentador de leite fixo com reciclo total ao longo do tempo para uma carga de 2 g/L de ProMalic <sup>®</sup> a 15°C.....	102
<b>Figura H.9</b> - Variação do pH no fermentador de leite fixo com reciclo total ao longo do tempo para uma carga de 5 g/L de ProMalic <sup>®</sup> a 15°C.....	103
<b>Figura H.10</b> - Variação do pH no fermentador de leite fixo com reciclo total ao longo do tempo para uma carga de 10 g/L de ProMalic <sup>®</sup> a 15°C.....	103
<b>Figura H.11</b> - Variação da absorvância a 400 nm no fermentador de leite fixo com reciclo total ao longo do tempo, para uma carga de 2 g/L de ProMalic <sup>®</sup> a 15°C. ....	103
<b>Figura H.12</b> - Variação da absorvância a 400 nm no fermentador de leite fixo com reciclo total ao longo do tempo para uma carga de 5 g/L de ProMalic <sup>®</sup> a 15°C .....	104
<b>Figura H.13</b> - Variação da absorvância a 400 nm no fermentador de leite fixo com reciclo total ao longo do tempo para uma carga de 10 g/L de ProMalic <sup>®</sup> a 15°C .....	104
<b>Figura H.14</b> - Variação da absorvância a 620 nm no fermentador de leite fixo com reciclo total ao longo do tempo para uma carga de 2 g/L de ProMalic <sup>®</sup> a 15°C .....	104
<b>Figura H.15</b> - Variação da absorvância a 620 nm no fermentador de leite fixo com reciclo total ao longo do tempo para uma carga de 5 g/L de ProMalic <sup>®</sup> a 15°C .....	105
<b>Figura H.16</b> - Variação da absorvância a 620 nm no fermentador de leite fixo com reciclo total ao longo do tempo para uma carga de 10 g/L de ProMalic <sup>®</sup> a 15°C. ....	105

<b>Figura I.1</b> - Perfil de concentração de ácido L-málico ao longo do tempo e respectiva linearização para um caudal de recirculação de 257 cm <sup>3</sup> /min a 15°C. ....	107
<b>Figura I.2</b> - Variação da acidez total ao longo do tempo para um caudal de recirculação de 257 cm <sup>3</sup> /min a 15°C .....	107
<b>Figura I.3</b> - Variação do pH ao longo do tempo para um caudal de recirculação de 257 cm <sup>3</sup> /min a 15°C. ....	107
<b>Figura I.4</b> - Variação da absorvância a 400 nm ao longo do tempo para um caudal de recirculação de 257 cm <sup>3</sup> /min a 15°C. ....	108
<b>Figura I.5</b> - Variação da absorvância a 620 nm ao longo do tempo para um caudal de recirculação de 257 cm <sup>3</sup> /min a 15°C. ....	108
<b>Figura J.1</b> - Perfil da concentração de ácido L-málico ao longo do tempo e respectiva linearização para um caudal de recirculação de 150 cm <sup>3</sup> /min a 15°C. ....	109
<b>Figura J.2</b> - Variação da acidez total ao longo do tempo para um caudal de recirculação de 150 cm <sup>3</sup> /min a 15°C. ....	110
<b>Figura J.3</b> - Variação do pH ao longo do tempo para um caudal de recirculação de 150 cm <sup>3</sup> /min a 15°C. ....	110



A acidez de um mosto ou vinho é um parâmetro com elevado interesse para o vinicultor, uma vez que está relacionada com as características organolépticas do vinho. Em condições de acidez excessiva é necessário proceder a uma desacidificação do mosto ou vinho por via biológica, física, mecânica ou química. A acidez total de um mosto ou vinho é essencialmente devida à concentração do ácido tartárico ou málico. Enquanto a desacidificação química altera a concentração do ácido tartárico, a desacidificação biológica altera a concentração do ácido málico podendo ocorrer por duas vias distintas: a fermentação maloláctica (FML) (realizada pelas bactérias lácticas) ou fermentação maloalcoólica (FMA) (realizada por leveduras *Schizosaccharomyces pombe*).

A Proenol produz e comercializa leveduras *Schizosaccharomyces pombe* imobilizadas em dupla camada de alginato, sob a marca registada ProMalic<sup>®</sup>. Esta levedura tem a capacidade de consumir o ácido L-málico transformando-o em etanol e dióxido de carbono. Quando comparada com bactérias lácticas, a levedura *Schizosaccharomyces pombe* apresenta vantagens uma vez que é mais tolerante às concentrações de anidrido sulfuroso, etanol, valor do pH, temperatura e exigências nutritivas. O ProMalic<sup>®</sup> surgiu como uma alternativa aos métodos de desacidificação por via biológica tradicional (FML) e por via química. A utilização de ProMalic<sup>®</sup> a nível industrial é possível usando sacos de rede ou porosos contendo as esferas re-hidratadas de ProMalic<sup>®</sup> nos mostos/ vinhos. No entanto, a necessidade de agitar os sacos no processo de desacidificação de volumes elevados de mosto e/ou vinhos para eliminar o dióxido de carbono e a falta e/ou dificuldade de acesso ao topo das cubas estiveram na origem deste estudo.

Neste trabalho, realizaram-se ensaios em descontínuo para avaliar o efeito da concentração de anidrido sulfuroso, concentração inicial de ácido L-málico, da temperatura e o efeito do etanol no processo de desacidificação levada a cabo pelo ProMalic<sup>®</sup>. Num segundo ponto, determinou-se a energia mínima necessária para que ocorra a fermentação, energia de activação ( $E_a$ ), comparando-se o seu valor com o valor da energia de activação quando se usa a levedura *Schizosaccharomyces pombe* na forma livre. Por fim, iniciou-se o estudo da utilização de um fermentador de leito fixo, no qual o ProMalic<sup>®</sup> funciona como um biocatalisador sólido, permitindo tratar elevados volumes de mosto/ vinho tendo em vista a implementação da montagem realizada a nível de adegas de modo a facilitar o processo de desacidificação de mostos/ vinhos.

---

**Capítulo I**

**Revisão Bibliográfica**

## **1. Vinho: História, Produção, Fermentação e Composição**

### **1.1. A História do vinho**

O vinho é produzido desde a Pré-História por diversos povos da Índia até à Península Ibérica. Esta bebida ocupou um lugar proeminente nos ritos e costumes dos povos Hebreus, Gregos e Romanos. Na Idade Média, a sua produção era uma importante actividade nos mosteiros que possuíam vastos vinhedos destinados à produção de vinhos litúrgicos, pelo que os monges podem ser considerados precursores da vinicultura moderna (Soares *et al*, 1996).

Ao longo dos tempos o processo de produção do vinho sofreu grandes alterações. Antigamente a qualidade dos vinhos dependia fortemente das condições climáticas, do ano da colheita e da temperatura ambiente a que ocorria a fermentação. Actualmente a inoculação de leveduras seleccionadas em mosto é uma prática enológica comum, pois permite obter vinhos com boa qualidade a nível organoléptico e manter a homogeneidade do vinho independentemente do ano de colheita. A maioria dos produtores de vinho recorre actualmente à utilização de culturas de arranque de leveduras, “*starters*”, previamente seleccionadas em função das boas capacidades fermentativas, como por exemplo as leveduras do género *Schizosaccharomyces pombe* (Schuller, 2006). Assim, o vinho produzido não depende essencialmente das leveduras endógenas e das condições intrínsecas da fermentação.

A história da viticultura e vinicultura moderna ficou especialmente marcada pelo início da produção de vinhos espumantes nas regiões de Champanhe e Borgonha e pela esterilização das videiras para combater a filoxera (Soares *et al*, 1996). Avanços recentes da tecnologia e genética têm conduzido a progressivas melhorias genéticas das castas de uvas seleccionadas, aumentando assim o nível de produtividade e a resistência às doenças.

### **1.2. Processo de produção do vinho (Vinificação)**

O vinho é uma bebida alcoólica que provém da fermentação total ou parcial do sumo de uvas esmagadas ou maceradas. Este sumo é designado por mosto (Peynaud, 1993).

A vinificação é o conjunto das operações efectuadas de modo a produzir vinho. Existem numerosos processos de vinificação correspondentes aos vários tipos de vinho,

distinguindo-se pela forma como se separam os diversos tecidos da uva (Peynaud, 1993). Na Figura 1, encontra-se representado de forma esquemática o processo de produção de vinho branco e tinto. É possível produzir vinho branco a partir de castas brancas ou tintas pois apesar das uvas provenientes de castas tintas terem a pele escura, a polpa da uva é branca. O processo de produção de vinho branco, a partir de uvas de castas tintas, consiste em apertar a uva levemente de modo a romper a pele, libertando apenas o sumo (Caves Aliança, 2003). Para a produção do vinho tinto, a fermentação realiza-se com a película da uva preta presente no mosto. (Peynaud, 1993).

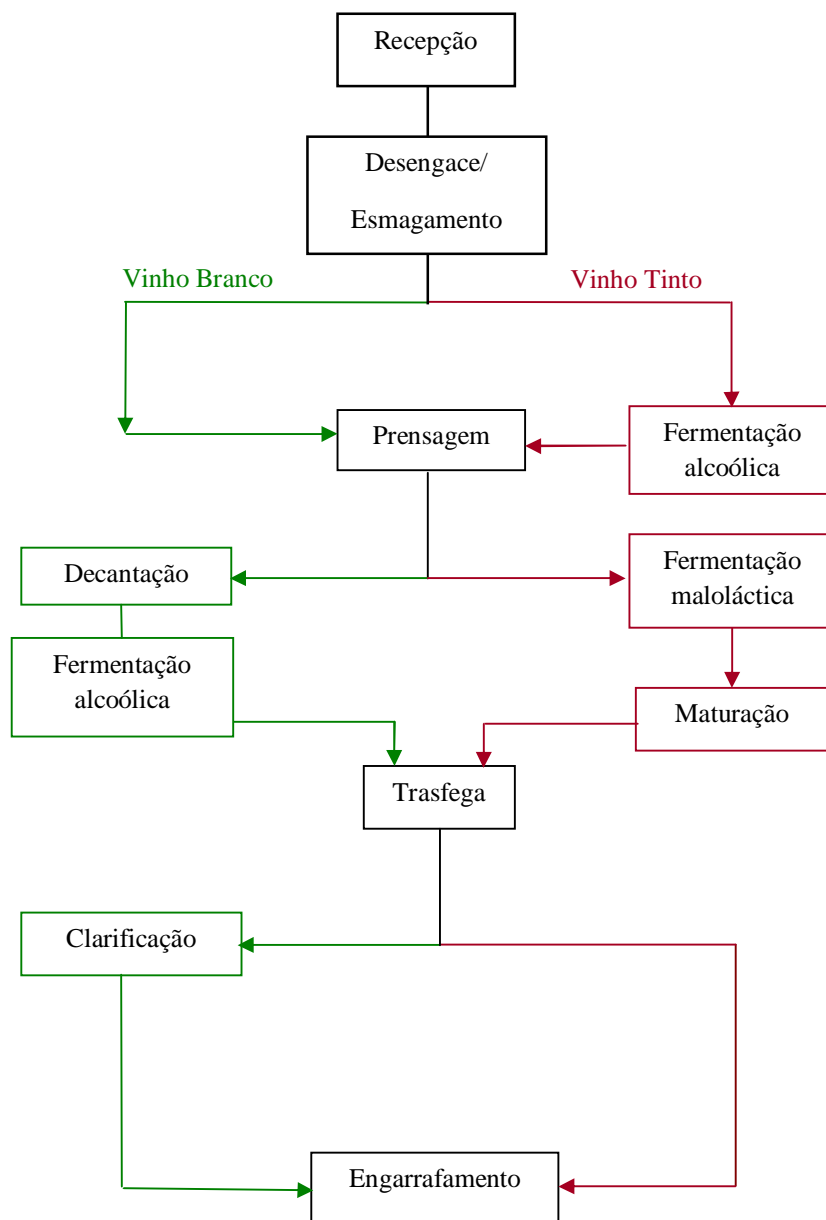
No processo de vinificação dos vinhos Branco e Tinto, algumas etapas são comuns enquanto outras são específicas de cada processo. De seguida far-se-á uma breve descrição das várias etapas.

Recepção – após a chegada das uvas à adega, estas são pesadas e submetidas a testes para determinação do valor do pH e da acidez do mosto e para obter uma estimativa do grau alcoólico do vinho que será produzido (Ferreira *et al*, 2008; Peynaud, 1993).

Após a selecção das uvas (selecção efectuada consoante o tipo de vinho, as castas pretendidas e o estado sanitário das uvas), estas sofrem um tratamento com anidrido sulfuroso de modo a evitar a sua oxidação (Ferreira *et al*, 2008; Infovini, 2008).

Desengace/Esmagamento – o processo de desengace consiste na separação do bago da uva do seu suporte, o canganho. O desengace é total na produção do vinho branco e parcial na produção do vinho tinto. O processo de esmagamento consiste em romper a película da uva de modo a libertar o seu sumo (Ferreira *et al*, 2008; Peynaud, 1993).

Prensagem – no caso do vinho branco, extrai-se o sumo de uva por acção de uma prensa, descartando a pele e grainhas das uvas (Ferreira *et al*, 2008; Infovini, 2008). No caso do vinho Tinto, a prensagem ocorre após a fermentação alcoólica, pois a pele e a grainha da uva devem estar em contacto com o mosto de modo a dar a cor ao vinho que se pretende produzir (Ferreira *et al*, 2008).



**Figura 1** – Esquema das várias etapas na produção de vinho Branco e Tinto (adaptado de Infovini, 2008).

Decantação – permite eliminar as partes sólidas que se encontram depositadas no fundo da cuba, uma vez que podem atribuir aromas indesejados ao vinho (Ferreira *et al*, 2008; Infovini, 2008).

Fermentação alcoólica – conjunto de reacções bioquímicas realizadas por leveduras (por exemplo: *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces ellipsoideus*, *Klockera apiculata*), que transformam os açúcares fermentiscíveis (glicose e frutose) em etanol e



dióxido de carbono (Delanoe *et al*, 1997; Peynaud, 1993). Actualmente, a adição de culturas de arranque específicas possibilita um maior controlo deste processo.

Clarificação – esta etapa exclusiva do processo de vinificação do vinho branco consiste na eliminação de impurezas em suspensão no vinho, tornando-o límpido. Existem duas técnicas de clarificação: a colagem e a filtração (Infovini, 2008). A colagem consiste numa sedimentação de partículas provocada por produtos clarificantes tais como gelatina, bentonite (argila) ou caseína (Ferreira *et al*, 2008; Infovini, 2008). O processo de filtração consiste na retenção de partículas suspensas no vinho. Existem diferentes tipos de filtração que se distinguem pelas diferentes camadas filtrantes, tais como terra de diatomáceas; placas de celulose ou módulos lenticulares; membranas em polímeros sintéticos ou filtração tangencial sobre membrana mineral ou orgânica (Carvalheira). Além disso, existem membranas esterilizantes adequadas para remover microorganismos devido ao reduzido diâmetro dos poros, possibilitando deste modo a paragem da fermentação e a obtenção do nível desejado de açúcar residual (Belitz *et al*, 1987).

Fermentação maloláctica – é uma etapa exclusiva do vinho tinto, com o objectivo de reduzir a acidez do vinho, que consiste na conversão do ácido málico em ácido láctico e em dióxido de carbono, pela acção de bactérias lácticas (Delanoe *et al*, 1997; Ferreira *et al*, 2008).

Maturação – é uma etapa exclusiva do vinho tinto relacionada com o envelhecimento do vinho. No caso do envelhecimento se processar em barricas de madeira, a maturação contribui para o apuramento de características organolépticas do vinho, tais como o sabor e o aroma (Ferreira *et al*, 2008; Infovini, 2008).

Engarrafamento – este é um passo com alguma importância, uma vez que pode condicionar todo o trabalho anteriormente realizado. Este processo consiste em colocar o vinho na garrafa e colocar a rolha. Durante o engarrafamento, deve-se minimizar a exposição do vinho ao ar para evitar a sua oxidação e contaminação microbiológica (Ferreira *et al*, 2008).

### 1.2.1. Adição do anidrido sulfuroso durante o processo de vinificação

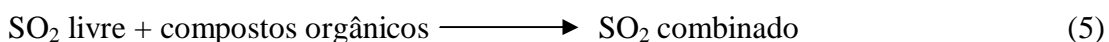
O anidrido sulfuroso é adicionado na indústria enológica uma vez que possui propriedades antioxidantes, anti-sépticas e anti-bacterianas que melhoram a conservação das uvas, mostos e vinhos (Cerdán *et al*, 2007a; Delanoe *et al*, 1997). A adição do anidrido sulfuroso inibe oxidações causadas por enzimas presentes na uva e o desenvolvimento de microorganismos de um modo selectivo, evitando deste modo a refermentação dos vinhos (Cerdán *et al*, 2007b; Gayon *et al*, 1998). O anidrido sulfuroso combina-se na presença de oxigénio dissolvido segundo a equação 1, esta reacção é lenta tornando o vinho imune a oxidações químicas. Além disso, o anidrido sulfuroso tem um efeito gustativo, protegendo os aromas e promovendo uma ligeira melhoria do gosto (Cerdán *et al*, 2007a; Delanoe *et al*, 1997). A adição de anidrido sulfuroso no processo de produção de vinho é permitida sob a forma de dióxido de enxofre gasoso (SO<sub>2</sub>), soluções de sulfuroso (H<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>), bissulfito de potássio (KHSO<sub>3</sub>) ou na forma de metabissulfito de potássio (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) (Garcia, 2005; Gayon *et al*, 1998).



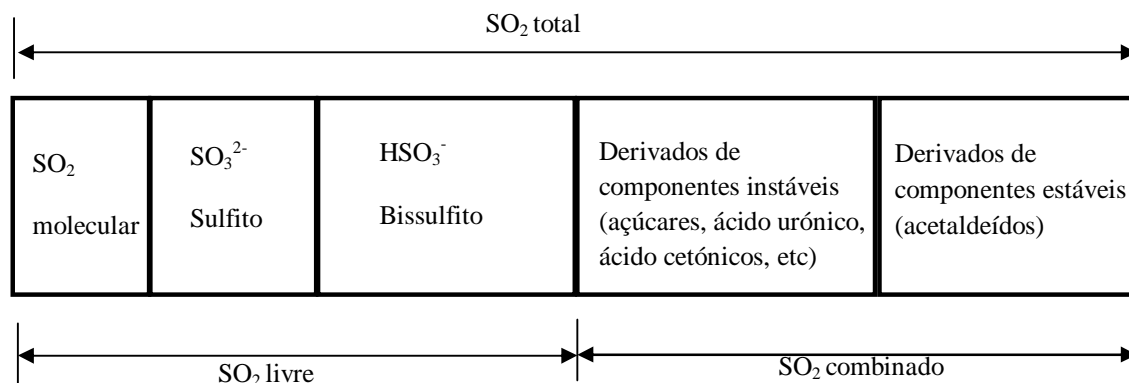
Durante o processo de solubilização do SO<sub>2</sub>, estabelecem-se os seguintes equilíbrios (equações 2 a 4):



Em soluções orgânicas tais como mostos e vinhos, o SO<sub>2</sub> reage com numerosos compostos formando o “SO<sub>2</sub> combinado” (Blouin, 2007).



Designa-se por “SO<sub>2</sub> total” a totalidade de SO<sub>2</sub> na forma livre e na forma combinada. Designa-se por “SO<sub>2</sub> livre” à forma molecular (H<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>), iões sulfito (SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) e bissulfito (HSO<sub>3</sub><sup>-</sup>); quanto ao “SO<sub>2</sub> combinado”, este combina-se com aldeídos, cetonas, ácido pirúvico, acetaldeídos e açúcares, Figura 2 (Gayon *et al*, 1998).



**Figura 2** – Esquema das diferentes formas do anidrido sulfuroso no vinho (adaptado de Carone, 2005)

As propriedades acima referidas são relativas ao anidrido sulfuroso na forma livre e a sua concentração aumenta com o aumento da temperatura e do teor alcoólico e a diminuição do valor de pH. Outros factores que influenciam a concentração de anidrido sulfuroso na forma activa são: (1) as características sanitárias das uvas dado que o facto de a uva se encontrar em condições sanitárias deficientes aumenta a probabilidade do anidrido sulfuroso se combinar devido à presença de numerosos compostos tais como oxofrutose, gluconolactona, di-hidroxiacetona (a combinação do anidrido sulfuroso pode variar entre 50-100/200 mg/L embora em óptimas condições sanitárias, varie entre 5 a 30 mg/L); (2) as características do vinho uma vez que o anidrido sulfuroso se combina facilmente com o etanal, ácido pirúvico, ácido oxoglucotartárico, açúcares, ácido oxaloacético, entre outros; (3) as condições sanitárias do local e técnicas usadas no processo de vinificação (por exemplo: filtração, centrifugação, colagem) (Blouin, 2007). Na legislação da maior parte dos países, o uso exagerado deste antiséptico tem vindo a diminuir devido à sua toxicidade. A quantidade de “SO<sub>2</sub> livre” permitida varia entre 10 e 30 mg/L (Gayon *et al*, 1998) e as quantidades máximas permitidas de “SO<sub>2</sub> total” dependem do teor de açúcares residuais, Tabela 1 (Blouin, 2007; Gayon *et al*, 1998; Regulamentação Vitivinícola, 1974).

**Tabela 1** - Quantidades máximas de anidrido sulfuroso total (mg/L) na legislação portuguesa e europeia (Blouin, 2007; Gayon *et al*, 1998; Regulamentação Vitivinícola, 1974).

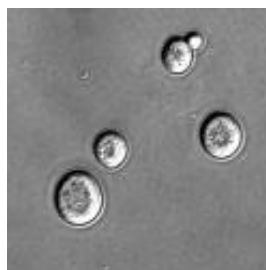
Tipo de vinho	Teor de açúcar residual	
	< 5 mg/L	> 5mg/L
Branco	210	260
Tinto	160	210

### 1.3. Processo de fermentação do vinho

A fermentação é uma etapa usada pelos seres vivos na obtenção de energia e importante na produção de vinhos embora necessite de um elevado controlo sobre as condições em que decorre o processo. A fermentação engloba duas transformações biológicas, a fermentação alcoólica e a fermentação maloláctica. A fermentação alcoólica é uma etapa comum a todos os tipos de vinho, enquanto a fermentação maloláctica é indispensável para garantir a qualidade do vinho tinto e deve ser evitada no caso de alguns vinhos brancos, devido ao facto de criar odores intrusivos para este tipo de vinho (Boulton *et al*, 1996). Estes dois processos serão a seguir descritos de forma mais detalhada.

#### 1.3.1. Fermentação alcoólica (FA)

Entende-se por fermentação alcoólica um conjunto de reacções bioquímicas provocadas por leveduras (Figura 3), tais como *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces ellipsoideus*, *Klockera apiculata*, que resultam na conversão dos açúcares fermentescíveis em etanol e dióxido de carbono e na formação de numerosos produtos secundários, tais como glicerol, ácidos voláteis e ésteres, entre outros que conferem os aromas ao vinho (Delanoe *et al*, 1997; Ferreira *et al*, 2008).



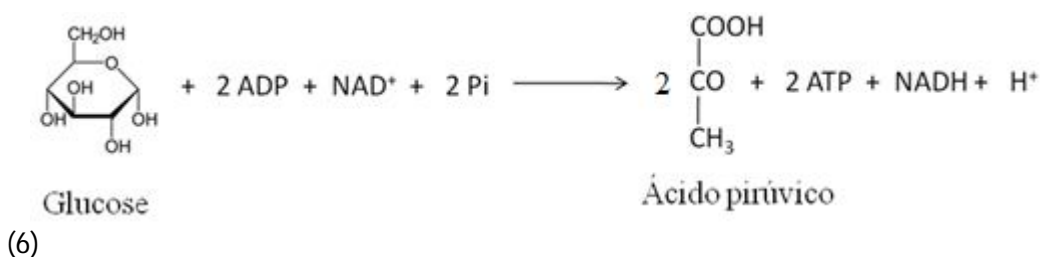
**Figura 3** – Imagem da levedura *Saccharomyces*<sup>1</sup>

As leveduras podem degradar os açúcares através de duas vias metabólicas, a fermentação anaeróbia (ausência de O<sub>2</sub>) e a fermentação aeróbia (presença de O<sub>2</sub>) (Gayon *et al*, 1998). Esta última está associada ao processo de crescimento das leveduras pelo que tem de ser realizada embora em reduzida extensão. A fermentação alcoólica é um processo

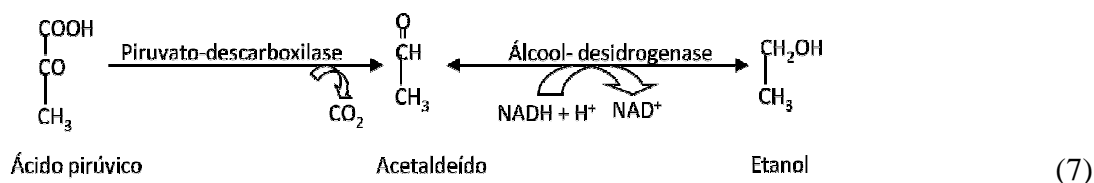
---

<sup>1</sup> Imagem retirada de: [http://www.steve.gb.com/science/model\\_organisms.html](http://www.steve.gb.com/science/model_organisms.html)

anaeróbio cuja primeira etapa é a glicólise; o processo consiste na oxidação de uma molécula de glucose em duas moléculas de ácido pirúvico, duas moléculas de ATP e uma molécula de NADH, equação 6 (Campos, 1999 ; Ferreira *et al*, 2008; Gayon *et al*, 1998).



O ácido pirúvico é posteriormente descarboxilado a acetaldeído e dióxido de carbono por acção de uma enzima, piruvato-descarboxilase. Seguidamente, o acetaldeído é reduzido a etanol numa reacção catalisada por uma álcool-desidrogenase, equação 7 (Campos, 1999; Gayon *et al*, 1998).



Pode ocorrer a paragem do processo de fermentação alcoólica devido a (1) elevado teor de álcool formado durante a fermentação alcoólica, devido ao efeito inibidor do álcool; (2) temperatura excessiva (acima de 30°C) uma vez que a temperaturas elevadas, as leveduras suportam mal o álcool, assimilam ineficientemente substâncias azotadas e podem cessar a sua actividade; (3) temperatura baixa (inferior a 12°C), uma vez que o processo de reprodução das leveduras é muito lento ou inexistente tornando o início da fermentação praticamente impossível; (4) anaerobiose, pois a ausência completa de oxigénio limita o crescimento das leveduras acabando por morrer se o estado de ausência de oxigénio se prolongar; (5) pH elevado (pH > 4), dado que estas condições facilitam o desenvolvimento de bactérias e de infecções; (6) pH baixo (pH < 3,1), pois este previne a acção bacteriana e a quantidade de “SO<sub>2</sub> livre” é superior, induzindo a produção de acidez volátil pela levedura (Collado, 2001; Ferreira *et al*, 2008; Peynaud, 1993).

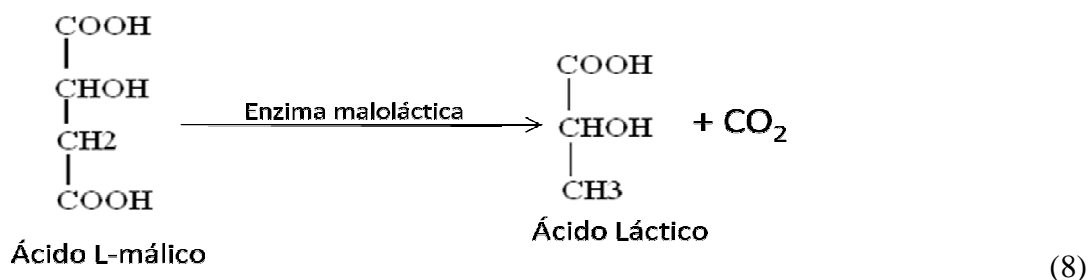
### 1.3.2. Fermentação maloláctica (FML)

Durante séculos, observou-se que determinados vinhos tintos turvavam e libertavam pequenas bolhas de gás após terminar a fermentação alcoólica. Esta ocorrência não prejudicava a qualidade dos vinhos, pelo contrário parecia melhorar o vinho (Oom, 1996). Esta transformação, de origem biológica, é provocada por bactérias lácticas e designa-se fermentação maloláctica (FML) (Lepe, 1997). As bactérias responsáveis pela FML são dos géneros *Leuconostoc* (Figura 4), *Pediococcus* e em menor extensão, *Lactobacillus* (Gayon *et al*, 1998; Oom, 1996).



**Figura 4** - Imagem da bactéria láctica do género *Leuconostoc*<sup>2</sup>.

A FML consiste basicamente numa reacção enzimática de descarboxilação bacteriana do ácido L-málico produzindo ácido láctico e dióxido de carbono (Husnik *et al*, 2006).



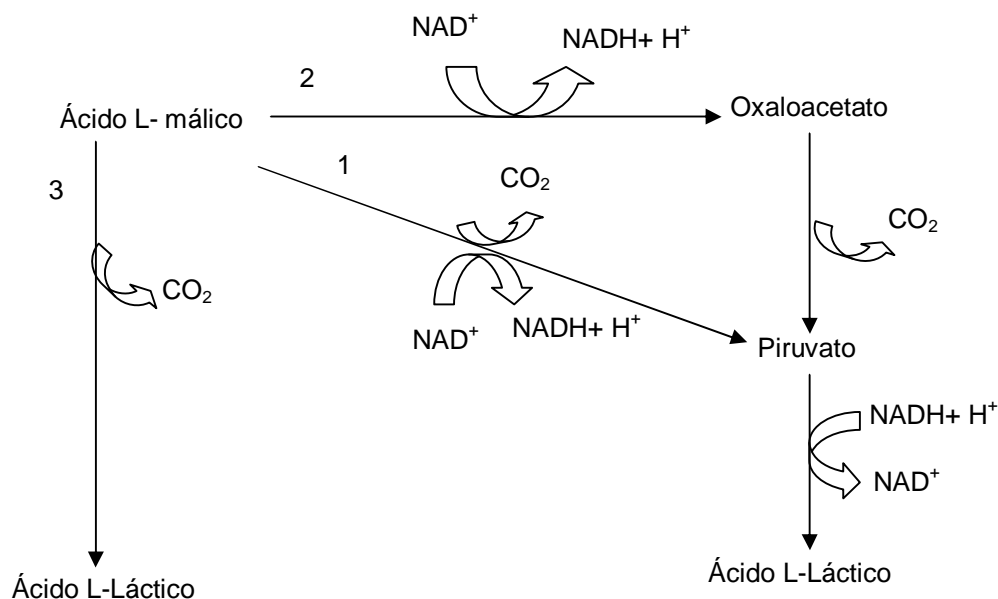
O resultado mais evidente da FML é a diminuição da acidez total, uma vez que o ácido L-málico é um ácido dicarboxílico enquanto o ácido láctico é um ácido monocarboxílico (Oom, 1996). Além disso aumenta a estabilidade do vinho, assegurando a não ocorrência da FML após o engarrafamento e melhorando o teor sensorial do vinho (Lepe *et al*, 1992; Peynaud, 1993). A ocorrência da FML depende essencialmente do tipo de bactérias lácticas presentes no vinho após o processo de fermentação alcoólica, do valor de pH, da concentração de etanol da concentração de anidrido sulfuroso no vinho e ainda

<sup>2</sup> Imagem retirada de: [http://genome.jgi-psf.org/finished\\_microbes/leume/leume.home.html](http://genome.jgi-psf.org/finished_microbes/leume/leume.home.html)

da disponibilidade de micronutrientes (Delpech, 2002; Hidalgo *et al*, 2006; Silva *et al*, 2002; Silva *et al*, 2003).

Dependendo das enzimas que as bactérias possuem, o ácido L-málico pode ser metabolizado por vias bioquímicas distintas (Figura 5). As bactérias, que possuem a enzima oxirredutase do malato, descarboxilam o ácido L-málico a piruvato e  $\text{CO}_2$  (1ª via da Figura 5). Seguidamente, o piruvato pode ser reduzido a ácido láctico por acção da enzima desidrogenase do lactato.

As bactérias, que possuem a enzima desidrogenase do malato, oxidam o ácido L-málico a oxaloacetato (2ª via da Figura 5). Este sofre uma descarboxilação originando piruvato, que posteriormente pode ser reduzido a lactato (Oom, 1996). As bactérias isoladas do vinho que possuem a enzima carboxilase do L-malato; catalisam a descarboxilação do ácido L-málico a ácido L-láctico sem formação de intermediários (3ª via da Figura 5) (Oom, 1996).



**Figura 5** – Esquema das três vias possíveis para a metabolização do ácido L-málico por bactérias lácticas, (Oom, 1996).

A ocorrência da FML é frequentemente difícil e o seu controlo é muito delicado, sendo um tema de preocupação tanto para investigadores como para os vinicultores (Camarasa *et al*, 2001; Oom, 1996). Nos últimos anos, desenvolveram-se alternativas para

o processo natural de FML, como por exemplo a utilização de culturas de arranque de bactérias lácticas livres (Biolact<sup>®</sup>, comercializado por Pascal BIOTECH) ou imobilizadas (ProBacter<sup>®</sup>, comercializado pela Proenol); a utilização de leveduras *Schizosaccharomyces pombe* para promover a fermentação maloalcoólica (FMA). Este tipo de fermentação será detalhado no ponto 2.1.

#### 1.4. Composição do vinho

O vinho tem uma composição muito complexa e o conhecimento da sua composição permite compreender melhor os fenómenos que intervêm nos processos de produção do vinho.

O vinho é composto essencialmente por água e etanol (Tabela 2), contendo aproximadamente 5% de compostos tais como açúcares, ácidos orgânicos, sais de ácidos minerais e orgânicos entre outros (Soleas *et al*, 1997). O álcool tem um papel importante na longevidade, estabilidade e qualidade do vinho e o seu teor varia entre 10 a 13% (Soleas *et al*, 1997). Devido à presença de açúcares não fermentescíveis na uva (pentoses, tais como arabinose e xilose) no final da fermentação, o vinho possui sempre uma quantidade residual de açúcar inferior a 1,5 g/L (Aquarone *et al*, 1983; Soleas *et al*, 1997).

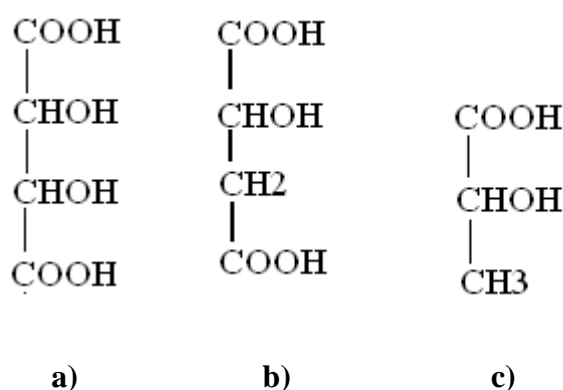
**Tabela 2** - Composição química típica do vinho Branco e Tinto (Soleas *et al*, 1997).

Compostos	Vinho Branco (%)	Vinho Tinto (%)
Água	84,73	84,53
Etanol	10	10
Glicerol	1,1	1,1
Açúcares	0,05	0,05
Ácidos orgânicos	0,7	0,6
Outros	3,4	3,4

Os ácidos orgânicos presentes no vinho são importantes para a constituição, estabilização e conservação, das propriedades organolépticas do vinho (Aquarone *et al*, 1983). Os principais ácidos orgânicos provêm da uva (ácido tartárico (Figura 6 (a)), ácido málico (Figura 6 (b)) e ácido cítrico) ou do processo de fermentação (ácido láctico (Figura 6 (c)), ácido succínico e ácido acético) (Gayon *et al*, 1998; Peynaud, 1993).



A acidez de um mosto ou de um vinho classifica-se como acidez fixa ou acidez volátil dependendo dos ácidos presentes no vinho. Os ácidos tartárico, málico, succínico, cítrico e láctico contribuem para a acidez fixa do vinho (são ácidos não destiláveis) enquanto a acidez volátil depende do ácido acético (Peynaud, 1993). A acidez total é a soma da acidez volátil e da acidez fixa (Delanoe *et al*, 1997). De acordo com a regulamentação europeia, a acidez total é expressa em miliequivalentes por litro (mEq/L) ou em gramas de ácido tartárico por litro (g ácido tartárico/L) (Delanoe *et al*, 1997).



**Figura 6** – Estrutura química dos ácidos tartárico (a), málico (b) e láctico (c) (Gayon *et al*, 1998).

O ácido tartárico é um dos ácidos mais fortes presentes no mosto e no vinho; a sua concentração varia entre 2 a 5 g/L e o pH do vinho depende muito do seu teor. Este ácido apresenta uma maior resistência à decomposição, por acção bacteriana, relativamente aos restantes ácidos orgânicos provenientes da uva. Por vezes, é adicionado aos vinhos, caso este tenha uma baixa acidez, dado que é responsável pela boa qualidade global do vinho (Peynaud, 1993).

O ácido málico é um dos principais ácidos presente na constituição do mosto, contribuindo fortemente para a acidez total e pH do vinho, sendo facilmente metabolizado pelas bactérias lácticas e leveduras *Schizosaccharomyces pombe* (Peynaud, 1993; Silva *et al*, 2002).

A presença de ácido láctico no vinho deve-se à sua formação durante a fermentação alcoólica dos açúcares (por acção das leveduras), por acção de bactérias durante a fermentação maloláctica ou pela fermentação láctica de açúcares, glicerol ou ácido tartárico (Peynaud, 1993).

## 2. Desacidificação de mostos e vinhos

A acidez, um parâmetro chave no equilíbrio organoléptico e estabilidade do vinho, depende essencialmente da concentração de ácido tartárico e de ácido málico (Strehaiano *et al*). A proporção e concentração destes ácidos variam consoante a casta, a região e as condições meteorológicas do ano de colheita (Silva *et al*, 2002). Uma acidez elevada requer um processo de desacidificação de forma a reduzir o seu valor para alcançar uma melhor qualidade e estabilidade microbiológica do mosto e/ou do vinho (Strehaiano *et al*). Salienta-se entretanto que um vinho desacidificado não deve conter menos de 1g/L de ácido tartárico de modo a não revelar falta de acidez (Garcia, 2005).

O processo de desacidificação pode ser efectuado por processos físicos, mecânicos químicos ou biológicos. A desacidificação física consiste na precipitação do hidrogenotartarato de potássio e do tartarato de cálcio de forma espontânea ou por arrefecimento (Garcia, 2005).

A desacidificação mecânica é realizada por um processo de melhoramento “Amelioration” ou mistura “Blending” (Belitz *et al*, 1987). O primeiro método é considerado um tipo de adulteração de vinho dado que envolve a adição de açúcar e água; o segundo método consiste na combinação de vinhos de diferentes variedades de uva ou de diferentes colheitas de modo formar um vinho mais consistente, com maior qualidade ou carácter ou para obtenção de uma cor desejada (Belitz *et al*, 1987; Boulton *et al*, 1996; Gonçalves, 2008).

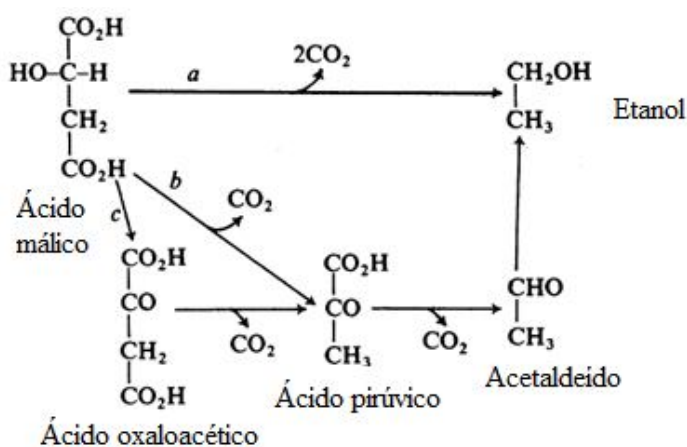
A desacidificação química consiste na adição de desacidificantes químicos, tais como carbonato de cálcio e bicarbonato de potássio, para promover a precipitação do ácido tartárico sob a forma de tartarato de cálcio, bitartarato de potássio e, em condições específicas, sob a forma de sal duplo tartarato malato de cálcio (Aquarone *et al*, 1983; García *et al*, 2006; Taillandier, 1990). Uma desvantagem do processo de desacidificação química consiste na precipitação conjunta do ácido tartárico com outros componentes responsáveis pela fracção aromática do vinho (García *et al*, 2006).

A desacidificação biológica pode ser efectuada através da fermentação maloláctica, com recurso a bactérias endógenas do mosto, através da fermentação alcoólico-láctica, recorrendo a leveduras fermentativas geneticamente modificadas de modo a possuírem a

enzima maloláctica característica das bactérias lácticas (Lepe, 1997; García, 2006) e através da fermentação maloalcoólica, por acção da levedura *Schizosaccharomyces pombe* (Lepe, 1997). Este processo será detalhado no ponto seguinte.

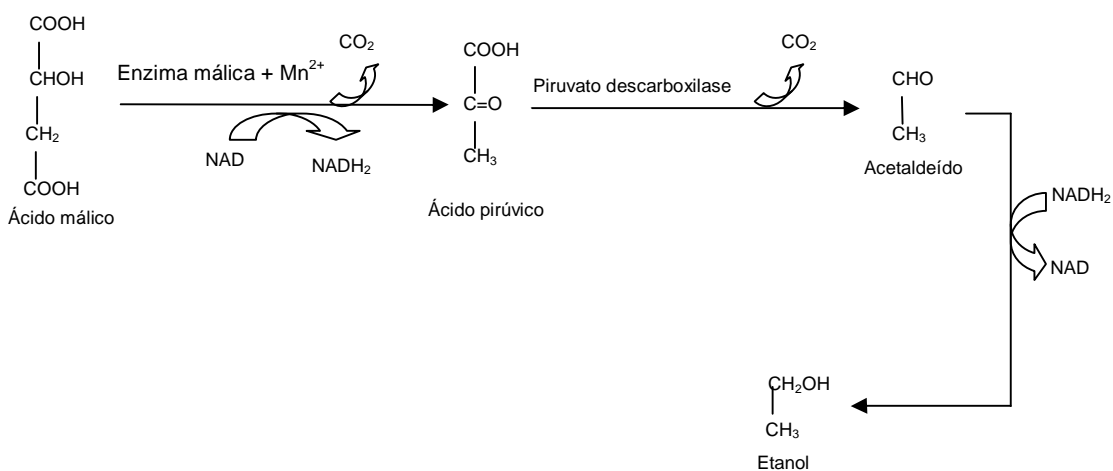
## 2.1. Fermentação maloalcoólica (FMA)

A fermentação maloalcoólica, realizada pela levedura *Schizosaccharomyces pombe*, pode consumir mais de 90% do ácido málico presente no mosto (Lepe, 1997). Teoricamente, existem três vias distintas para a degradação do ácido L-málico (ver Figura 7). Maconi *et al* (1983) verificaram experimentalmente que o mecanismo da fermentação maloalcoólica envolve a oxidação e descarboxilação do ácido málico a ácido pirúvico, seguindo-se uma descarboxilação a acetaldeído e respectiva redução a etanol, mecanismo c da Figura 7 (Maconi *et al*, 1983).



**Figura 7** – Mecanismos em estudo para a fermentação maloalcoólica (Maconi *et al*, 1983).

Este mecanismo é actualmente aceite podendo ser representado pelas equações da Figura 8 (Lepe *et al*, 1992).



**Figura 8** – Esquema do processo de fermentação maloalcoólica (Lepe *et al*, 1992).

Tal como se representa na Figura 8, o primeiro passo da fermentação maloalcoólica consiste na transformação do ácido málico em ácido pirúvico com recurso a uma enzima málica (desidrogenase do malato), ião  $Mn^{2+}$  e o cofactor NAD (Lepe *et al*, 1992; Lepe 1997; Osothsilp *et al*, 1986). Posteriormente, o ácido pirúvico é descarboxilado a acetaldeído na presença da enzima piruvato-descarboxilase. O último passo é a redução do acetaldeído a etanol envolvendo o  $NADH_2$  (Lepe *et al*, 1992; Lepe 1997).

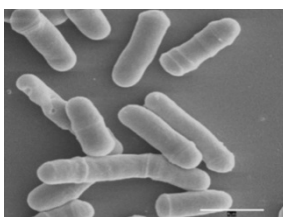
### 3. Levedura *Schizosaccharomyces pombe*

Leveduras são microorganismos com um grande interesse a nível industrial, quer na produção e transformação de alimentos, quer na produção de compostos químicos. São constituídas por uma parede rígida, de natureza essencialmente polissacarídica, que lhes confere uma certa imobilidade. Para que ocorra o crescimento da levedura é necessária a presença de compostos orgânicos, que funcionam como fonte de carbono e de energia e de compostos azotados essenciais para a síntese de proteínas. A identificação das leveduras é feita por processos de isolamento e purificação, sendo esta baseada na morfologia das células vegetativas, no tipo de reprodução e nas características sexuais, fisiológicas e bioquímicas (Alcântara *et al*, 2001).

As leveduras *Schizosaccharomyces* originais da África do Sul têm sido estudadas desde 1982, no Instituto de Investigações Vitivinícolas da Hungria, visando a degradação biológica do ácido L-málico (Lepe *et al*, 1992; Lepe, 1997; Silva *et al*, 2002). Os primeiros trabalhos envolveram a selecção de bactérias lácticas e leveduras, do género *Schizosaccharomyces*, com bom rendimento alcoólico e elevado consumo de ácido málico, sem características sensoriais negativas. Os investigadores do Instituto de Investigações Vitivinícolas de Hungria mencionaram tratar-se de uma degradação muito difícil, fortemente dependente das características fisiológicas da levedura e das etapas tecnológicas utilizadas na vinificação (Lepe, 1997). Concluíram que a degradação do ácido málico com leveduras do tipo *Schizosaccharomyces* é possível, mas durante a fermentação maloalcoólica só pode estar presente a *Schizosaccharomyces* pelo que é necessária uma esterilização do mosto. Após a degradação total do ácido L-málico, é necessário remover a levedura porque o contacto prolongado com o mosto promove o aparecimento de um gosto desagradável e consequente redução das qualidades do vinho (Lepe, 1997).

Existem quatro espécies de leveduras pertencentes ao género *Schizosaccharomyces*: *pombe*, *octoporus*, *japonicus* e *malidevorans* (Lepe, 1997). Todas as espécies têm a capacidade de degradar o ácido málico formando uma molécula de etanol e duas de dióxido de carbono, mas a levedura *Schizosaccharomyces pombe* demonstrou ter uma maior eficácia na degradação do ácido málico presente nos mostos, transformando o ácido málico em etanol, paralelamente à fermentação alcoólica (Lepe *et al*, 1992; Silva *et al*, 2002; Taillandier, 1990).

A espécie *Schizosaccharomyces pombe* (Figura 9) foi descrita por Lindner em 1883, (referenciado por Lepe, 1997) e posteriormente por Suárez em 2004. Quanto às características taxonómicas, pertence à família *Saccharomycetaceae* e à sub-família *Saccharomycoidea*. As suas células são cilíndricas e alongadas, com diâmetro de 3 a 5 µm e 6 a 16 µm de comprimento, surgindo isoladas ou em pares. Quanto às características fisiológicas e bioquímicas, reproduzem-se vegetativamente por cisão ou esquizogonia através da formação de um septo no meio da célula (Lepe *et al*, 1992; Taillandier, 1990). São leveduras ascosporogéneas ou de esporulação com a capacidade de formar um pseudomicélio, são incapazes de assimilar nitrato e não formam uma nata à superfície do mosto. Apresentam um poder fermentativo da ordem de 10 a 12,6% de etanol em condições anaeróbicas e 13 a 15% de etanol em condições com ligeiro arejamento (Lepe, 1997).



**Figura 9** – Imagem da levedura *Schizosaccharomyces pombe*<sup>3</sup>

A desacidificação com a levedura *Schizosaccharomyces pombe* apresenta diversas vantagens, uma vez que esta levedura é bastante tolerante à concentração de etanol, à concentração de anidrido sulfuroso presente em mostos e/ou vinhos, tolerante a valores de pH ácidos e temperaturas baixas (inferiores a 12°C), possui reduzidas exigências nutritivas,

<sup>3</sup> Imagem retirada de: <http://www.bscb.org/?url=newsletter/summer2006/pombe>

apresenta resistência aos teores elevados de açúcar e tem uma boa capacidade de crescimento no mosto e vinho. Normalmente, a sua cultura é fácil (Delpech, 2002).

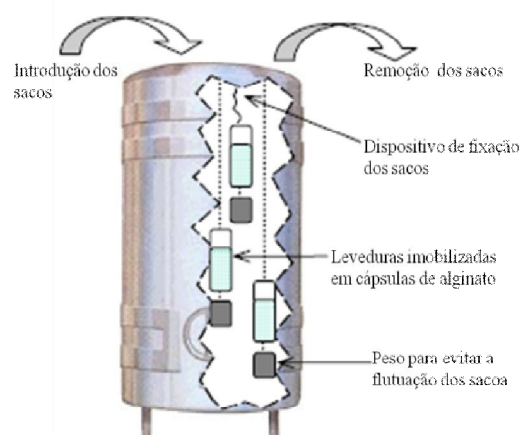
Contrariando o que foi referenciado por Lepe e outros autores, Strehaiano e Taillandier (2001) concluíram que o consumo de ácido L-málico ocorre sem consumo de açúcar e que em competição com a levedura *Saccharomyces*, a *Schizosaccharomyces pombe* é inibida (Taillandier et al, 1995; Strehaiano et al 2001). Outros inconvenientes da sua utilização consistem na baixa velocidade de degradação do ácido L-málico e na produção de aromas e sabores indesejáveis relacionados com o metabolismo dos açúcares após o ácido málico ter sido degradado (Taillandier, 1990). A eliminação da levedura *Schizosaccharomyces pombe* do meio torna-se assim um processo essencial mas complicado quando as leveduras são usadas na forma livres. A sua imobilização facilita a remoção do meio fermentativo (García et al, 2006).

As técnicas de imobilização de leveduras permitem a retenção das células e proporcionam um controlo mais preciso do processo de fermentação quando comparado com métodos tradicionais (García et al, 2006). Por exemplo possibilitam o funcionamento em reactores contínuos com taxas de diluição elevadas, muito superiores à taxa de crescimento máxima do microorganismo sem que ocorra “wash-out” (Cabral et al, 2003; Casablancas et al, 1998; Taillandier, 1990). A presença de concentrações elevadas de biocatalisador permite a diminuição de contaminação do produto e uma maior conversão volumétrica mais rápida minimizando a ocorrência de reacções secundárias (Cabral et al, 2003; Casablancas et al, 1998). A presença de concentrações elevadas de biomassa imobilizada permite obter velocidades de reacção e produtividade mais elevadas. Os custos de produção são menores devido à maior estabilidade da actividade enzimática e ao controlo mais preciso e simples do processo de desacidificação (total ou parcial). A remoção da levedura é mais fácil, permitindo a valorização dos aromas e da frescura dos vinhos (Casablancas et al, 1998; Taillandier, 1990). Contudo existem limitações ao uso de biocatalisadores imobilizados tais como a perda de actividade catalítica durante a etapa de imobilização (devido à exposição a condições de pH, temperatura ou tensão de corte extremas e a reagentes tóxicos), a perda de actividade catalítica devida à matriz de imobilização (exclusão de macromoléculas, variações locais de pH e restrições à transferência de massa) e a perda de actividade catalítica durante a bioconversão (perda do

biocatalisador, crescimento celular superior à capacidade de retenção da matriz e poros com diâmetro variado) (Cabral *et al*, 2003; Casablanco *et al*, 1998).

Existem vários métodos de imobilização de biocatalisadores tais como a reticulação com reagentes bifuncionais e a imobilização em suportes sólidos. Este último método subdivide-se em duas categorias: a ligação a um suporte e a oclusão em matrizes porosas (por exemplo, oclusão em gel e microencapsulação). Uma destas técnicas de imobilização consiste no encapsulamento da levedura em esferas de dupla camada de alginato de cálcio (Cabral *et al*, 2003; Delpech, 2002; García *et al*, 2006). A imobilização em dupla camada evita a perda das leveduras para o mosto e/ou vinho proporcionando um controlo mais eficaz do processo de fermentação quando comparado com outros métodos tradicionais (Taillandier, 1990).

A *Schizosaccharomyces pombe* imobilizada em dupla camada de alginato, ProMalic<sup>®</sup>, é actualmente utilizada em diversas adegas. O procedimento de utilização (Figura 10) consiste em colocar sacos de rede contendo as esferas de ProMalic<sup>®</sup> re-hidratadas dentro da cuba. No caso de se utilizarem vários sacos, estes devem ser distribuídos a diferentes alturas sendo necessário agitá-los periodicamente devido à acumulação de dióxido de carbono (produzido durante a fermentação maloláctica) na parte exterior das esferas (Proenol, 2004).



**Figura 10** - Esquema da utilização da levedura *Schizosaccharomyces pombe* imobilizada em dupla camada de alginato em adegas (Proenol, 2004).

O método actualmente utilizado apresenta desvantagens quanto à sua utilização, pelo facto dos acessos ao topo das cubas nem sempre serem fáceis e quando se tratam diversas



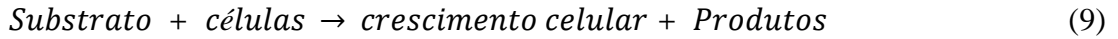
cubas, a necessidade de agitar periodicamente os sacos de ProMalic<sup>®</sup> torna-se uma tarefa demorada e fastidiosa. O objectivo principal deste estudo prende-se com o melhoramento do processo de desacidificação já existente facilitando, o processo para volumes elevados de mosto e/ou vinho a tratar e para isso, recorreu-se a um reactor biológico de leito fixo com reciclo total operando em descontínuo.

#### 4. Fermentadores

Os fermentadores, reactores biológicos, são unidades processuais onde ocorre a biorreacção, sendo um elemento fundamental em qualquer processo biotecnológico (Fonseca *et al*, 2007). As configurações mais comuns de reactores biológicos são: 1) de tanque agitado; 2) leito fixo; 3) leito fluidizado; 4) coluna de bolhas e 5) circulação por arejamento (“air-lift”). O tanque agitado é o mais utilizado em processos industriais, em que o agitador tem várias funções em simultâneo: auxilia a transferência de massa e de calor, agita e homogeneiza o meio reaccional (Fonseca *et al*, 2007). O reactor de leito fixo tem uma maior aplicabilidade quando se trata de sistemas que envolvam células ou enzimas imobilizadas, caracterizando-se pelo movimento constante de substrato através de um leito que contém as células/enzimas imobilizadas, permitindo obter velocidades reaccionais significativas. No entanto, apresenta desvantagens tais como a má homogeneização do fluído, dificuldade na libertação de dióxido de carbono e resistência à transferência de massa e de calor devido à baixa velocidade de recirculação do fluido (Fonseca *et al*, 2007).

Reactores de leito fluidizado surgem como alternativa a reactores de leito fixo, porque apresentam uma melhor transferência de massa e de calor (Fonseca *et al*, 2007). Reactor de coluna de bolhas proporciona o contacto entre a fase líquida e gasosa enquanto o reactor de circulação por arejamento consiste basicamente numa coluna de bolhas dividida em duas secções onde se injecta o gás permitindo a circulação do fluido. Quanto ao modo de operação de reactores biológicos, classificam-se em operação contínua, semi-contínua ou em descontínuo (Fonseca *et al*, 2007).

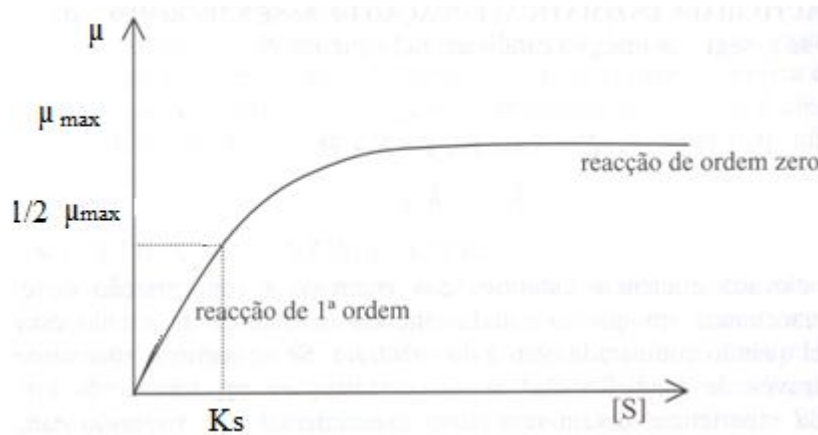
Com base na cinética de Michaelis-Menten para enzimas, Monod propôs um modelo para a cinética de crescimento celular descrevendo o crescimento celular em função da disponibilidade de substrato da seguinte forma:



$$\mu = \mu_m \frac{S}{K_s + S} \quad (10)$$

onde  $\mu$  é a velocidade específica de crescimento ( $\text{h}^{-1}$ );  $\mu_m$  ( $\text{h}^{-1}$ ) representa a velocidade máxima específica de crescimento;  $S$  é a concentração de substrato ( $\text{g/L}$ ) e  $K_s$  é a constante de Monod ( $\text{g/L}$ ) (Casablanco *et al*, 1998; Fonseca *et al*, 2007).

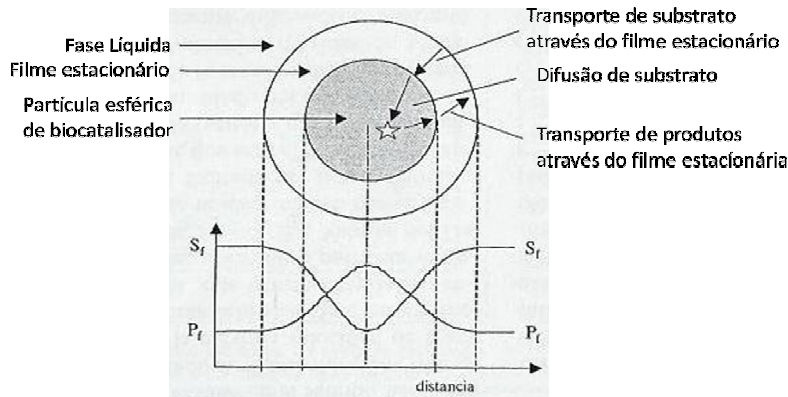
A Figura 11 ilustra a dependência da velocidade específica de crescimento relativamente à concentração de substrato. Para concentrações de  $S$  inferiores a  $K_s$ , a cinética de crescimento é de primeira ordem e a velocidade de crescimento depende linearmente da concentração de substrato enquanto para concentrações de  $S$  relativamente superiores a  $K_s$ , a cinética de crescimento é de ordem zero e a velocidade de crescimento torna-se independente da concentração de substrato; para  $K_s$  aproximadamente igual à concentração de  $S$ , é de ordem intermediária entre 0 e 1 (Casablanco *et al*, 1998; Fonseca *et al*, 2007).



**Figura 11** - Variação da velocidade específica de crescimento em função da concentração de substrato segundo a equação de Monod (adaptado de Casablanco *et al*, 1998).

A imobilização das células apresenta comportamentos fisiológicos (transporte de substrato e produtos no meio líquido ou no interior da partícula) e metabólicos distintos das células na forma livre (Casablanco *et al*, 1998). A actividade do biocatalisador após o processo de imobilização é quantificada pela actividade observada, embora não sendo a própria actividade do biocatalisador, pois depende da interacção entre a transferência de

massa e a cinética do biocatalisador. A Figura 12 esquematiza os processos que ocorrem quando a partícula sólida com células imobilizadas se encontra no meio líquido.



**Figura 12** - Interação do processo de transferência de massa e reação numa partícula de biocatalisador imobilizado (Casablancas *et al*, 1998).

Uma vez que o consumo de substrato ocorre no interior da partícula, estabelece-se um perfil de concentrações entre a fase líquida e a superfície da partícula de biocatalisador. Num primeiro passo, ocorre a transferência de massa do exterior para o interior da partícula, seguido do processo de difusão do substrato no interior da partícula e simultânea ocorrência de reação. O processo de transporte do meio para a partícula de catalisador é dado pela equação 11.

$$N_s = k_{ms}(S_f - S_s) \quad (11)$$

onde  $N_s$  representa o fluxo de substrato ( $\text{mol/m}^2\text{s}$ );  $k_{ms}$  é o coeficiente de transferência de massa externa ( $\text{m/s}$ );  $S_f$  é a concentração de substrato na fase líquida ( $\text{mol/m}^3$ ) e  $S_s$  é a concentração de substrato à superfície do catalisador ( $\text{mol/m}^3$ ). O coeficiente de transferência de massa externo depende das propriedades físicas do líquido e do diâmetro das partículas (Casablancas *et al*, 1998).

Tendo em conta a cinética de Monod para o crescimento celular, obtém-se a seguinte equação:

$$N_s = k_{ms}(S_f - S_s) = \frac{r_m S_s}{K_s + S_s} \quad (12)$$

A imobilização do biocatalisador permite estabelecer perfis de concentração no interior da partícula devido à ocorrência simultânea do processo de difusão e reação.

---

**Capítulo II**

**Material e Métodos**

## 1. Levedura

A levedura utilizada para o processo de fermentação maloláctica do mosto e vinho foi a levedura *Schizosaccharomyces pombe* imobilizada em dupla camada de alginato, designada comercialmente por ProMalic®.

De acordo com as instruções da Proenol, o ProMalic® é armazenado a frio (4°C), recomendando-se que se deixe atingir a temperatura ambiente antes da sua utilização. Na desacidificação de mostos, procede-se à sua re-hidratação numa solução aquosa com 40 g/L de açúcar (o volume da solução de açúcar deve ser 5 mL/g ProMalic) durante um período de 4 a 5h.

Quando se pretende tratar vinho, a re-hidratação deve ser realizada com uma solução de 5 mL/ g ProMalic contendo 1/3 de vinho a desacidificar e 2/3 de solução de solução de açúcar a 40 g/L.

As condições prévias necessárias à realização dos ensaios foram:

- concentração de ácido L-málico no mosto: 2, 5 e 8 g/L;
- concentração de açúcares no mosto na ordem de 200 g/L;
- carga de ProMalic®: 1 g/L;
- pH do mosto na ordem de 3;
- temperatura variável entre 10 e 22°C.

Estes valores foram escolhidos com o objectivo de recriar as condições reais do mosto dado que a concentração usual de ácido L-málico no mosto varia entre 2 e 5 g/L podendo atingir 8 g/L em casos extremos, a concentração de açúcares no mosto varia entre 140 e 230 g/L, o pH situa-se entre 3 e 4 e o intervalo de temperatura foi a gama de valores a que ocorre a fermentação.

Todo o trabalho foi realizado em condições de esterilidade ou seja, os materiais utilizados foram autoclavados.

## 2. Preparação e caracterização da solução de mosto

O mosto fornecido, com uma concentração na ordem de 800 g/L de açúcares, foi armazenado a 4°C e adicionou-se anidrido sulfuroso para a sua conservação. A diluição do

mosto foi efectuada consoante a quantidade necessária para a realização dos ensaios. Uma vez que uma das condições prévias para efectuar os ensaios foi uma concentração de açúcares na ordem de 200 g/L, efectuou-se uma diluição de 1:4. A solução de mosto deve estar em condições de esterilidade e para tal, recorreu-se ao método de esterilização por filtração no sistema Millipore (membrana filtrante com poro nominal de 0,2  $\mu\text{m}$ ) sendo amostra filtrada recolhida à chama para garantir esterilização do filtrado.

### 2.1. Determinação da massa específica e viscosidade da solução de mosto diluído

A massa específica da solução de mosto foi determinada por pesagem de um volume rigoroso de mosto utilizando um balão aferido [volume  $25 \pm 0,04 \text{ cm}^3$  e massa  $27,0740 \pm 0,00005 \text{ g}$ ]. A massa específica da solução de mosto é de  $1,08 \text{ g/cm}^3$ .

A viscosidade do mosto foi determinada com um Viscosímetro Mettler RM 180 Rheomat usando 25 mL de solução de mosto num tubo de vidro termostatizado a 15°C. A 15°C, a viscosidade da solução de mosto é de 7 cP.

## 3. Fermentação em descontínuo

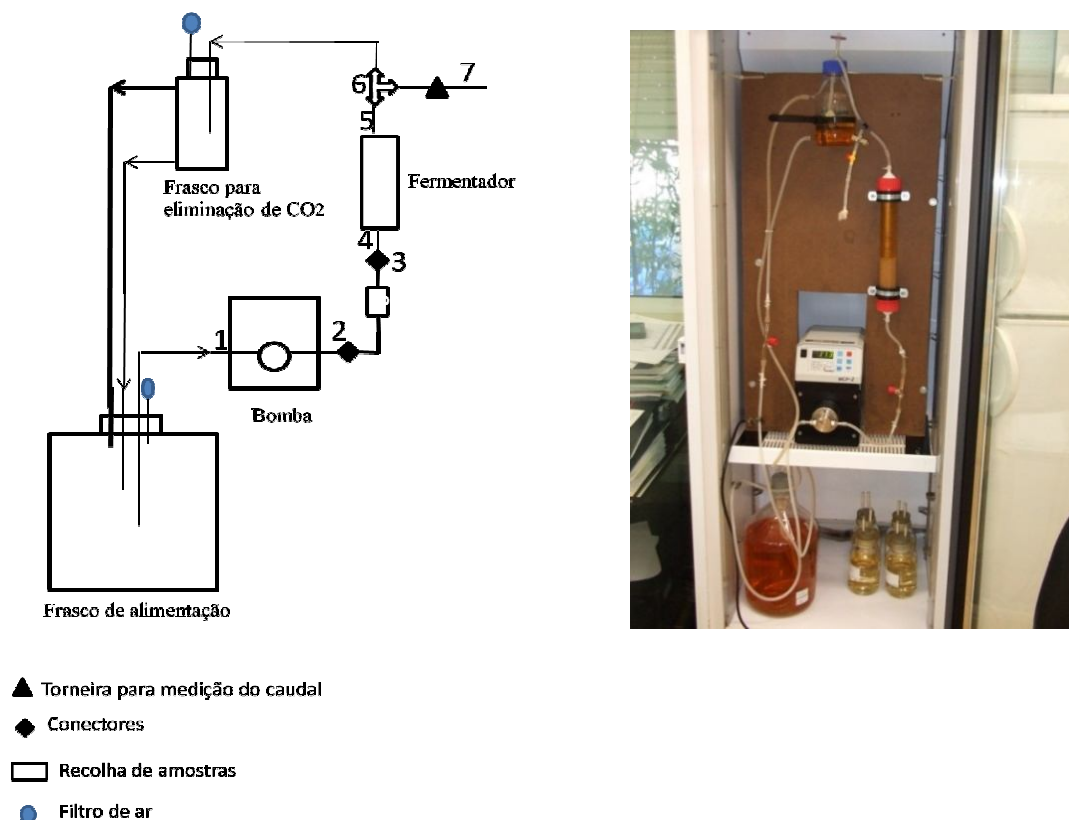
As fermentações em descontínuo prepararam-se segundo os seguintes passos. Em frascos de 500 mL com rolha de algodão, introduziram-se 430 mL de mosto estéril cuja concentração de ácido L-málico e pH foi acertada com ácido L-málico e ácido ortofosfórico a 85%, respectivamente, e inoculou-se com 1 g/L de ProMalic<sup>®</sup> re-hidratado. Efectuaram-se diferentes tipos de ensaios em duplicado e ensaios testemunha sem adição de ProMalic<sup>®</sup> para diferentes concentrações de anidrido sulfuroso, ácido L-málico e temperatura. Retiraram-se amostras diárias para análises posteriores de concentração de ácido L-málico e açúcares usando o ABX Pentra 400 (o método de determinação encontra-se detalhado no ponto 5). Os ensaios foram terminados quando a concentração de ácido L-málico atingiu um valor na ordem de 0,5 g/L e removeram-se as esferas de ProMalic<sup>®</sup> com recurso a um crivo. Centrifugou-se a solução de mosto com a centrífuga Sigma 6K10 a 4°C e 4300 rpm durante 15 minutos e determinaram-se as concentrações finais de ácido L-málico, açúcares, anidrido sulfuroso, acidez total e pH. O procedimento para os ensaios com vinho branco foi similar ao procedimento anteriormente descrito para diferentes temperaturas e concentrações de ácido L-málico.

#### 4. Fermentador de leito fixo com reciclo total

Durante a realização dos ensaios no fermentador de leito fixo com reciclo total, surgiram vários problemas tais como a dificuldade na eliminação de gás produzido durante a fermentação malolalcoólica, a turvação do mosto pela levedura do tipo *Saccharomyces* e a impossibilidade da medição do caudal ao longo do processo de desacidificação. De modo a eliminar tais ocorrências, foi necessário alterar várias vezes a montagem experimental, sendo o primeiro passo a eliminação do gás. Esta foi conseguida com a utilização de um frasco lavador onde o mosto foi retido depois de sair do fermentador. Nesse frasco lavador, colocou-se um filtro que permite a eliminação do gás formado. Num segundo passo, foi necessário colocar uma saída de líquido para o exterior de modo a permitir a medição do caudal. Posteriormente, eliminou-se a presença de turvação uma vez que esse ponto estava relacionado com a falta de esterilidade por parte do reactor. Dado que este não era resistente às altas temperaturas imprescindíveis à esterilização (material acrílico), substituiu-se por um reactor de vidro e teflon (resistentes a altas temperaturas). Deste modo, a montagem experimental pôde ser totalmente esterilizada no autoclave e a eliminação da turvação do meio foi conseguida em alguns ensaios; a Figura 13 ilustra a montagem experimental optimizada.

##### 4.1. Montagem e funcionamento do fermentador

O fermentador, cujo diâmetro interno é de 3,62 cm, foi alimentado pela bomba Ismatec MCP-Z, que bombeou o meio fermentativo do frasco de alimentação. O interior do fermentador continha esferas de vidro para homogeneizar a distribuição do meio fermentativo que posteriormente, passou pelas esferas de ProMalic<sup>®</sup>. Na saída do fermentador, havia um tubo em forma de T em que uma das extremidades permitiu a medição do caudal e a outra extremidade permitiu a passagem do meio fermentativo pelo frasco para a eliminação do gás voltando novamente ao frasco de alimentação. Refira-se a existência de um ponto de recolha de amostras antes do fermentador, Figura 13.



**Figura 13** - Esquema e fotografia da montagem experimental.

#### 4.2. Esterilização do material

O material utilizado na montagem experimental foi esterilizado quimicamente ou autoclavado. A cabeça da bomba foi esterilizada com uma solução de oxónia de concentração 2%, cujo princípio activo é o ácido paracético; este passo consistiu em passar a solução de oxónia durante cerca de 20 minutos com um caudal na ordem de 300 mL/min pela cabeça da bomba. Posteriormente, passou-se água estéril para eliminar a solução de oxónia, utilizando fitas indicadoras de ácido paracético para verificar se foi totalmente eliminado.

O restante material foi esterilizado pelo método de esterilização com calor húmido, em autoclave e temperatura de 121°C durante 15 minutos. As extremidades 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 foram protegidas com algodão, papel Kraft sendo este enrolado em fita de autoclave para comprovar o sucesso da esterilização (quando a fita passou a ter riscas pretas). O frasco para a eliminação de CO<sub>2</sub> e o frasco de alimentação foram colocados desenroscado e aberto, respectivamente, no autoclave para evitar a pressão. Concluída a esterilização no



autoclave, os frascos foram fechados e colocou-se todo o material na câmara de fluxo laminar para permanecer em ambiente estéril.

#### 4.3. Funcionamento

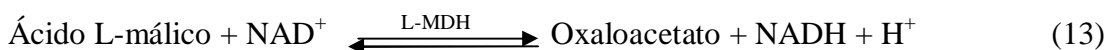
Após esterilização e arrefecimento do material, colocou-se o mosto estéril no frasco de alimentação (5 L) e as esferas de ProMalic<sup>®</sup> re-hidratadas no fermentador. Por fim, uniram-se as extremidades 5 e 6, colocou-se a montagem no painel e unindo-se as extremidades 1 e 2 à cabeça da bomba. Mediram-se os caudais e recolheram-se amostras diárias para análises posteriores de concentração de ácido L-málico e de açúcares, determinação da acidez total, pH e densidade óptica com recurso ao espectrofotómetro Hach Dr/2000 a 400 e 620 nm.

### 5. Determinação da concentração de ácido L-málico e de açúcares

A determinação da concentração de ácido L-málico e de açúcares foi efectuada com base em métodos enzimáticos no ABX Pentra 400. De seguida, descreve-se sumariamente a base dos métodos.

#### 5.1. Determinação da concentração de ácido L- málico

Na presença da L-malato desidrogenase (L-MDH), o ácido L-málico é transformado em oxaloacetato (equação 13) que é convertido em L-aspartato na presença de L-glutamato (equação 14) por acção da enzima glutamato-oxaloacetato-transaminase (GOT).



Deste modo, garante-se a conversão total do ácido L-málico em NADH cuja concentração é determinada pelo aumento de absorvância a 340 nm.

#### 5.2. Determinação da concentração de açúcares

A concentração de açúcares (glucose e frutose) baseia-se na sua fosforilação com ATP [equações (15) e (16), respectivamente] catalisada pela hexocinase (HK).

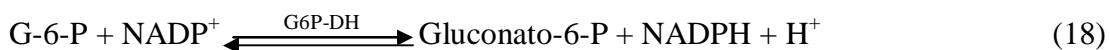




onde G-6-P e F-6-P designam glucose-6-fosfato e frutose-6-fosfato, respectivamente. A F-6-P é transformada em G-6-P pela enzima fosfoglucoase isomerase (PGI) (equação 17):



Na presença de glucose-6-fosfato desidrogenase (G6P-DH), a glucose-6-fosfato é oxidada pelo nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato (NADP) a gluconato-6-fosfato, formando-se a nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato reduzido (NADPH) (equação 18).



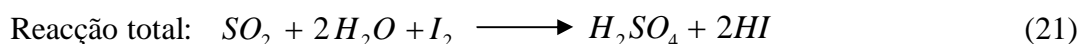
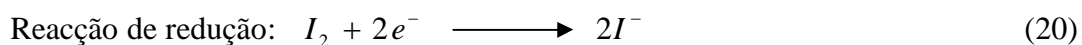
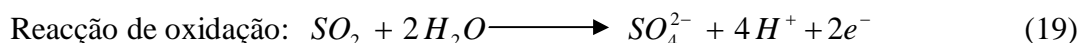
A G-6-P formada reage principalmente com o NADP formando-se gluonato – 6 – fosfato e NADPH. A concentração de NADPH formado é determinada pelo aumento de absorvância a 340nm sendo proporcional à concentração de glucose e frutose existente na amostra em estudo.

## 6. Determinação da concentração de anidrido sulfuroso livre e total

A determinação da concentração de anidrido sulfuroso é feita por dois métodos: o método de Ripper simples e o método de Ripper duplo. O método de Ripper simples é um método bastante utilizado devido à sua simplicidade embora apresente um erro elevado de cerca de 7 mg/L (Carone, 2005).

### 6.1. Método de Ripper simples

A determinação de teores de anidrido sulfuroso livre e total é baseada no método de Ripper simples; o princípio deste método consiste no doseamento do anidrido sulfuroso tendo por base uma reacção de oxidação do SO<sub>2</sub> pelo iodo em meio ácido (Equações 19 a 21):



O procedimento experimental para a determinação do anidrido sulfuroso livre baseia-se em duas titulações. Na primeira titulação, o volume gasto de solução de iodo permite determinar todos os compostos oxidáveis pela solução de iodo (tais como anidrido sulfuroso e polifenóis, entre outros). Na segunda titulação, o peróxido de hidrogénio combina-se com o anidrido sulfuroso deixando os restantes compostos livres no mosto para serem oxidados pela solução de iodo. A diferença entre os volumes gastos da solução de iodo nas duas titulações permite determinar o volume gasto da solução de iodo na oxidação do anidrido sulfuroso.

Para a primeira titulação, pipetam-se 10,00 mL de solução de mosto para um Erlenmeyer, adiciona-se 1,00 mL de solução de cozimento de amido<sup>4</sup> a 1% e 1,00 mL de ácido sulfúrico<sup>5</sup> 6,52 M; titula-se com uma solução de iodo  $5 \times 10^{-3} \text{M}$  (0,01N) (até obtenção de coloração roxa persistente).

Para a segunda titulação, pipetam-se 10,00 mL de solução de mosto para um Erlenmeyer, adiciona-se 1,00 mL de amido a 1%, 1,00 mL de ácido sulfúrico 6,52 M e duas gotas de peróxido de hidrogénio 10 V/V (3,26 M); titula-se com uma solução de iodo  $5 \times 10^{-3} \text{M}$  (0,01N) (até obtenção de coloração roxa persistente).

O teor de anidrido sulfuroso livre, expresso em mg/L, é determinado tendo em conta a seguinte equação:

$$SO_{2, \text{livre}} = \frac{(V_1 - V_2) \times N \times 32 \times 1000}{V_a} \quad (22)$$

onde  $V_1$  representa o volume de solução de iodo gasto na 1ª titulação, na oxidação de sulfuroso e outros constituintes do vinho;  $V_2$  representa o volume de solução de iodo gasto na 2ª titulação, na oxidação dos constituintes do vinho; N é a normalidade da solução de iodo; 32 é o equivalente -grama anidrido sulfuroso e  $V_a$  representa o volume da amostra de mosto.

O procedimento experimental para a determinação do anidrido sulfuroso total baseia-se na titulação de 25,00 mL de solução de mosto colocados num Erlenmeyer juntamente

<sup>4</sup> A adição de solução de amido (indicador) permite visualizar o ponto de equivalência pela mudança de cor (até obtenção de coloração roxa persistente).

<sup>5</sup> A adição de ácido sulfúrico permite a estabilização do meio por acidificação.

com 10,00 mL de hidróxido de sódio<sup>6</sup> 1 M. Após repousar durante 5 minutos, juntam-se 5,00 mL de ácido sulfúrico 6,52 M e 2,50 mL da solução de cozimento de amido a 1% e titula-se com uma solução de iodo a  $1 \times 10^{-2}$  M (0,02 N) (até obtenção de coloração roxa persistente).

O teor de anidrido sulfuroso total, expresso em mg/L, é determinado através da equação 23:

$$SO_{2, total} = \frac{V \times N \times 32 \times 1000}{Va} \quad (23)$$

onde V representa o volume da solução de iodo gasto nesta titulação e os restantes termos têm o mesmo significado que na equação 22.

O erro associado a este método deve-se à oxidação do sulfito durante a alcalinização, principalmente na presença de polifenóis, à recombinação do anidrido sulfuroso livre com acetaldeído no momento da acidificação e à formação de substâncias que reagem facilmente com o iodo durante o processo de alcalinização dos vinhos.

## 6.2. Método de Ripper duplo

O procedimento para a determinação da concentração de anidrido sulfuroso livre baseia-se na titulação de 50,00 mL de solução de mosto, a que se adiciona 5,00 mL de solução de cozimento de amido 5 g/L, 30 mg de EDTA<sup>7</sup> e 3,00 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,58 M, com uma solução de iodo a 0,025 M (até obtenção de coloração roxa persistente). O teor de anidrido sulfuroso livre (mg/L) é calculado pela equação 24:

$$SO_{2 \text{ livre}} = 32V_1 \quad (24)$$

onde V<sub>1</sub> é o volume de iodo usado na titulação.

As seguintes titulações permitem a determinação da concentração de anidrido sulfuroso combinado. Após a primeira titulação, adicionam-se 8,00 mL de NaOH 4 M, agitando-se uma vez e deixa-se a repousar durante 5 minutos. Seguidamente, junta-se de uma só vez 10 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,58 M, agitando-se energicamente e titula-se com a solução de iodo a 0,025 M (V<sub>2</sub>: volume gasto de iodo).

<sup>6</sup> A adição da solução de hidróxido de sódio alcaliniza o meio, permitindo a passagem de todo o anidrido sulfuroso combinado a livre.

<sup>7</sup> O EDTA, um agente quelante, liga-se ao anidrido sulfuroso na forma livre evitando a sua combinação com o oxigénio.

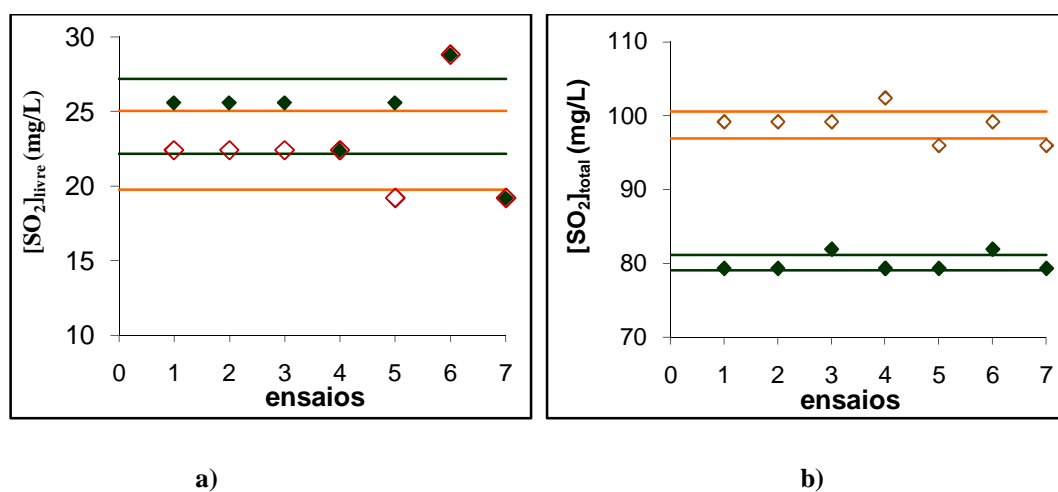
Por fim, adiciona-se à solução anteriormente titulada 20,00 mL de NaOH<sup>8</sup> 4 M, agitando-se a solução uma só vez e deixa-se em repouso durante 5 minutos. Dilui-se em 200 mL de água tão fria quanto possível, adicionam-se de uma só vez 30 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,58 M, agitando-se energeticamente e titula-se com a solução de iodo 0,025 M (V<sub>3</sub>: volume gasto de iodo).

O teor de anidrido sulfuroso total é dado pela expressão:

$$\text{SO}_2_{\text{total}} = 32 (V_1 + V_2 + V_3) \text{ (mg/L)} \quad (25)$$

### 6.3. Teste da reprodutibilidade do método de Ripper simples e duplo

Com o objectivo de testar a reprodutibilidade do método de Ripper simples, compararam-se os resultados obtidos com os resultados do método de Ripper duplo, Figura 14.



**Figura 14-** Comparação da concentração de anidrido sulfuroso na forma livre (a) e total (b) para o método Ripper simples (◆) e para o método de Ripper duplo (◇) e respectivos intervalos de confiança.

Analisando a Figura 14, verifica-se que a concentração de anidrido sulfuroso na forma livre é igual em ambos os métodos, uma vez que os intervalos de confiança se intersectam. Quanto à concentração de anidrido sulfuroso total, registaram-se valores diferentes para os dois métodos, sendo o mais elevado no método de Ripper duplo. A

<sup>8</sup> A adição de NaOH na 3ª titulação permite libertar o anidrido sulfuroso que não se libertou na 2ª titulação.

análise do anidrido sulfuroso total é mais precisa que a análise do anidrido sulfuroso livre, dado que o intervalo de confiança é menor.

### 7. Determinação da acidez total

A acidez total presente no mosto é determinada com base numa titulação ácido-base usando o indicador azul de Bromotinol. Antes de se proceder à titulação, é necessário eliminar o dióxido de carbono (este não é incluído na acidez total) por agitação do solução durante cerca de 5 minutos, ou no caso de o mosto apresentar turvação, por centrifugação recorrendo à centrífuga Sigma 6K10 (15 minutos a 4300 rpm).

Após a remoção de CO<sub>2</sub>, pipetam-se 5 mL da solução de mosto para um Erlenmeyer, adicionam-se 10 gotas de azul de Bromotinol e titula-se com hidróxido de sódio a 0,1 M (0,1 N), até se observar uma cor verde-azulada. A acidez total é expressa em g/L de ácido tartárico sendo calculada pela equação 26:

$$A_T = \frac{V_t \times N_1 \times 75}{V_a} \quad (26)$$

Onde N<sub>1</sub> é a normalidade da solução de hidróxido de sódio; V<sub>t</sub> representa o volume de hidróxido de sódio gasto; V<sub>a</sub> representa o volume da amostra e 75 é o equivalente grama de ácido tartárico.

---

**Capítulo III**

**Resultados e Discussão**

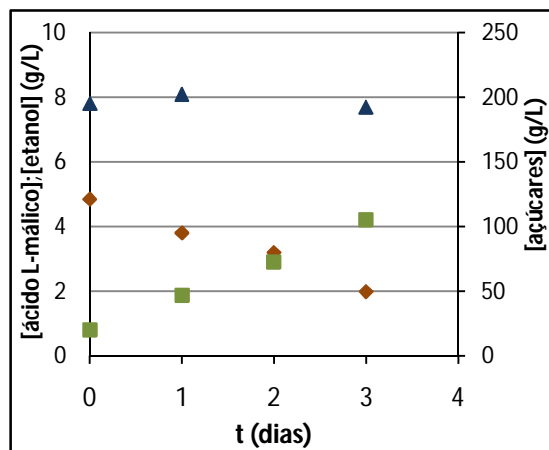
A levedura *Schizosaccharomyces pombe* imobilizada em dupla camada de alginato, designada comercialmente por ProMalic<sup>®</sup>, já deu provas da sua capacidade para transformar o ácido L-málico em etanol e dióxido de carbono (García *et al*, 2006). Com o objectivo de estudar e otimizar as condições de fermentação maloalcoólica de mosto realizaram-se ensaios em descontínuo (*batch*) em diferentes condições utilizando ProMalic<sup>®</sup>: avaliou-se a influência da concentração de anidrido sulfuroso, da concentração de ácido L-málico e da temperatura no processo de desacidificação de mosto; realizaram-se ensaios *batch* com levedura *Schizosaccharomyces pombe* na forma livre a diferentes temperaturas; e avaliou-se o efeito do etanol no processo de desacidificação, realizando-se ensaios similares em que se substituiu o mosto por vinho branco.

Seguidamente, preparou-se e montou-se uma instalação experimental, destinada a posterior implementação a nível industrial, com um reactor de leito fixo em reciclo total. Realizaram-se ensaios em condições idênticas às dos ensaios realizados em *batch* e no final, realizou-se um ensaio com interacção entre as leveduras *Schizosaccharomyces pombe* e *Saccharomyces cerevisiae*. Em todos os ensaios, procedeu-se à determinação da concentração de ácido L-málico e de açúcares ao longo do tempo para confirmar o consumo de ácido L-málico e ausência de consumo de açúcares pelo ProMalic<sup>®</sup>, respectivamente, durante o processo de fermentação. Os resultados apresentados são valores médios uma vez que foram realizados ensaios duplicados.

### **1. Comprovação da ocorrência da fermentação maloalcoólica**

Com o intuito de comprovar que a levedura *Schizosaccharomyces pombe* tem a capacidade de transformar o ácido L-málico em etanol, através da fermentação maloalcoólica (Lepe *etal*, 1992; Silva *etal* 2002; Taillandier, 1990), e uma vez que não era possível determinar a concentração de etanol na Proenol, foram requisitadas análises ao etanol no laboratório de Biotecnologia do Departamento de Química da Universidade de Aveiro. As análises foram efectuadas recorrendo à técnica de HPLC e os resultados são apresentados na Figura 15, juntamente com os resultados da concentração de açúcar e ácido L-málico.





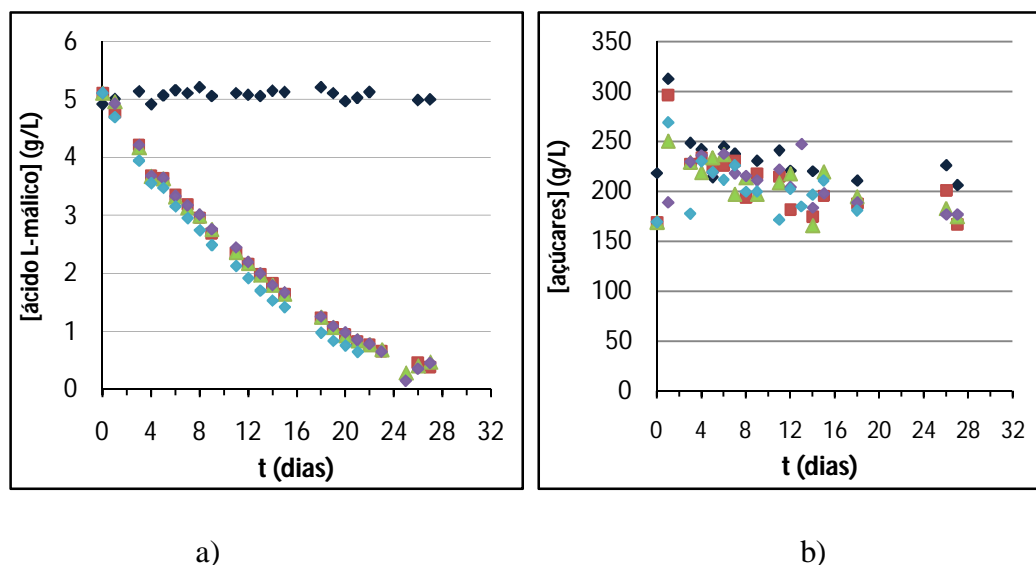
**Figura 15** - Evolução inicial das concentrações de ácido L-málico, etanol e de açúcares ao longo do processo de fermentação de mosto com ProMalic® (ácido L-málico (◆); etanol (■) e açúcares (▲)).

Analisando a Figura 15, é possível confirmar a ocorrência do processo de fermentação maloalcoólica, dado que ocorre em simultâneo consumo de ácido L-málico e produção de etanol, mantendo-se constante a concentração de açúcares, de acordo com o descrito por Strehaiano *et al* 2001.

## 2. Influência de diferentes factores no processo de desacidificação descontínuo de mosto

### 2.1. Anidrido Sulfuroso

O anidrido sulfuroso ( $\text{SO}_2$ ) é adicionado ao mosto e vinho pelo vitivinicultor uma vez que possui propriedades antioxidantes, anti-sépticas, anti-bacterianas e de conservação dos vinhos (Cerdán *et al*, 2006; Delanoe *et al*, 1997). De modo a avaliar o efeito da concentração do anidrido sulfuroso no processo de desacidificação pela levedura *Schizosaccharomyces pombe* imobilizada, realizaram-se ensaios em *batch* com concentrações de anidrido sulfuroso livre na ordem de 0, 15, 30 e 40 mg/L, tendo-se apresentado os resultados obtido na Figura 16 e Tabela 3.



**Figura 16** – Perfis de concentração de ácido L-málico (a) e de açúcares (b) ao longo do processo de desacidificação do mosto realizado pelo ProMalic<sup>®</sup> com uma carga de 1 g/L a 15°C para avaliar o efeito da concentração de anidrido sulfuroso livre (testemunha 0 mg/L SO<sub>2</sub> sem levedura (◆), 0 mg/L SO<sub>2</sub> (■), 15 mg/L SO<sub>2</sub> (▲), 30 mg/L SO<sub>2</sub> (◆) e 40 mg/L SO<sub>2</sub> (◆)).

A análise do gráfico da Figura 16 (a) demonstra que não há consumo de ácido L-málico na ausência de ProMalic<sup>®</sup> comprovando que a desacidificação do mosto não ocorre na ausência de levedura e que não existem diferenças relevantes na velocidade de degradação do ácido L-málico com a variação da concentração inicial do anidrido sulfuroso na gama de 0 - 40 mg/L, sendo também possível observar que as curvas apresentam um decaimento exponencial de 1ª ordem semelhante a uma parte da curva de Monod correspondente à reacção de primeira ordem (Casablancas *et al*, 1998). A concentração de açúcares presente no mosto é elevada e possíveis consumos residuais não são detectáveis, considerando-se que se mantém praticamente constante ao longo do processo fermentativo, Figura 16 (b) (Strehaiano *et al*, 2001). No decorrer de alguns dos ensaios, observou-se a turvação do meio (Tabela 3), facto este associado à libertação da levedura *Schizosaccharomyces pombe* da dupla camada de alginato. Quando a levedura se liberta, o consumo de ácido L-málico torna-se mais rápido dado que não existe a dupla camada de alginato para limitar a transferência de substrato e de produtos entre o meio e a levedura.

A velocidade de consumo de ácido L-málico foi determinada pela tangente à curva de concentração vs. tempo para os primeiros sete dias após a inoculação, para que a

velocidade de consumo não seja afectada pela presença de turvação no mosto. Uma vez que os ensaios foram realizados em descontínuo (não há entradas nem saídas ao longo do tempo) e o volume da mistura reaccional é constante, a velocidade de consumo de ácido L-málico ( $-r_A$ ) é dada pela equação (27) (Fogler, 1992):

$$\frac{d C_A}{dt} = -r_A \quad (27)$$

onde  $C_A$  representa a concentração de ácido L-málico.

**Tabela 3** - Valores médios iniciais e finais de pH, concentração de ácido L-málico, acidez total e concentração de anidrido sulfuroso na forma livre e total e primeiro dia de observação de turvação do meio para os ensaios em que se estudou o efeito da concentração de anidrido sulfuroso livre no mosto.

[SO <sub>2</sub> ] <sub>livre</sub> (mg/L)	pH		[ácido L-málico] (g/L)		A <sub>T</sub> (g/L ácido tartárico)		[SO <sub>2</sub> ] <sub>livre</sub> (mg/L)		[SO <sub>2</sub> ] <sub>total</sub> (mg/L)	Turvação (dia)
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Final	1º e 2º ensaio
testemunha	3,01	2,81	5,11	5,00	9,68	9,68	6,20	0,00	15,36	----
0	3,01	3,03	5,11	0,36	9,68	5,66	6,20	4,00	17,92	15; 26
15	3,01	3,02	5,11	0,37	9,68	5,89	14,40	0,00	21,12	26; ----
30	3,01	3,01	5,11	0,36	9,68	5,74	35,20	0,00	28,16	25; ----
40	3,01	3,01	5,11	0,53	9,68	5,74	40,00	2,00	45,44	----; 24

**Tabela 4** – Valores médios da velocidade de consumo de ácido L-málico e respectivo coeficiente de correlação para os ensaios em que se estudou o efeito da concentração inicial de anidrido sulfuroso livre no mosto.

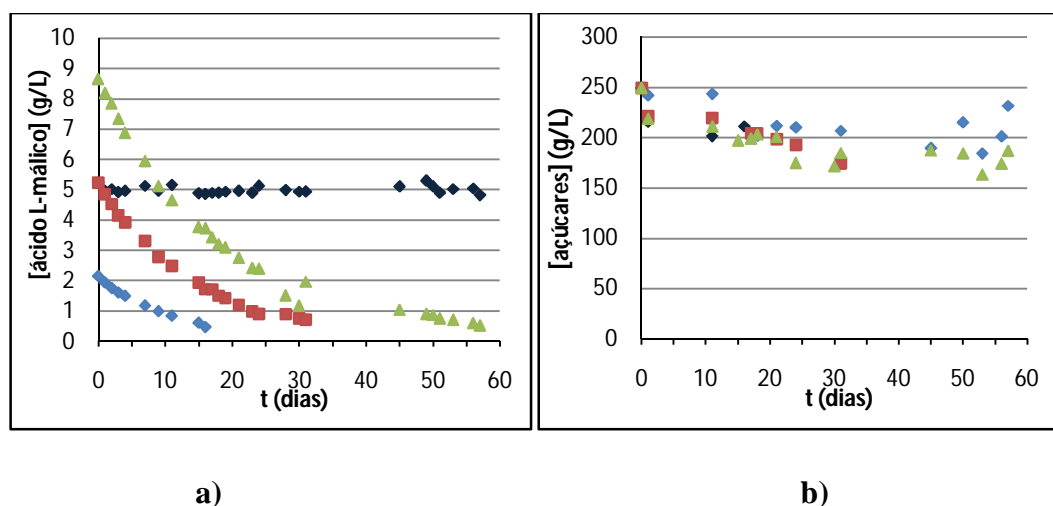
[SO <sub>2</sub> ] <sub>livre</sub> (mg/L)	r <sub>0</sub> (g/L dia)	Coeficiente de correlação
0	0,28	0,977
15	0,30	0,973
30	0,29	0,974
40	0,31	0,977

Pela análise dos resultados da Tabela 3, verifica-se que a acidez total diminuiu durante o processo de desacidificação, uma vez que o seu valor depende essencialmente da concentração de ácido tartárico e de ácido málico, conforme o descrito por Peynaud, 1993 e Silva *et al*, 2002. A diminuição da acidez total presente no mosto deve-se à redução da concentração de ácido L-málico por acção da levedura *Schizosaccharomyces pombe*, uma vez que esta transforma o ácido L-málico (dicarboxílico) em etanol e dióxido de carbono

que não apresentam qualquer grupo ácido. A concentração de anidrido sulfuroso na forma livre diminui o que demonstra a combinação do anidrido sulfuroso com o oxigénio de acordo com a equação 1. Uma vez que o anidrido sulfuroso não foi medido ao longo do ensaio, não foi possível saber em que momento do ensaio ocorreu a combinação do  $\text{SO}_2$ , tornando os ensaios inconclusivos quanto ao efeito do  $\text{SO}_2$ . No ensaio com concentração inicial de  $\text{SO}_2$  livre de cerca de 30 mg/L, verifica-se que a concentração final de  $\text{SO}_2$  total é inferior ao valor inicial de anidrido sulfuroso na forma livre e, uma vez que a concentração do anidrido sulfuroso total é dada pela soma das concentrações de anidrido sulfuroso nas formas livre ( $\text{SO}_2$  molecular, ião sulfito e bissulfito) e combinada (Gayon *et al*, 1998), põe-se em causa o método de Ripper simples (no capítulo de metodologias, encontra-se um estudo da reprodutibilidade dos métodos de Ripper, subcapítulo 6.3). Pela análise dos resultados da Tabela 4, constata-se que a velocidade de consumo do ácido L-málico é sensivelmente igual nos 4 ensaios realizados, nada se podendo concluir quanto ao efeito da concentração inicial do anidrido sulfuroso livre no processo de desacidificação.

## 2.2. Ácido L-málico

Avaliou-se o efeito da concentração de ácido L-málico no processo de desacidificação do mosto, realizando-se ensaios com concentrações de 2, 5 e 8 g/L de ácido L-málico e apresentando-se os resultados obtidos na Figura 17.



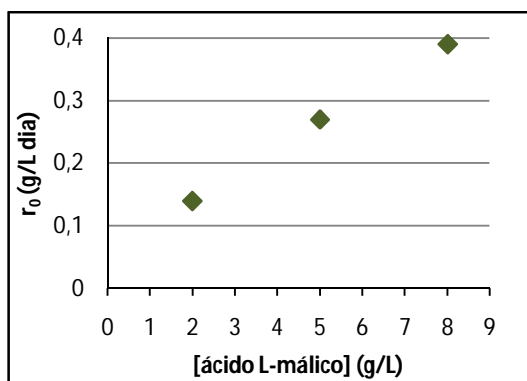
**Figura 17** – Perfis de concentração de ácido L-málico (a) e de açúcares (b) para avaliar o efeito da concentração inicial de ácido L-málico no processo de desacidificação do mosto realizado pelo ProMalic<sup>®</sup> com uma carga de 1 g/L a 15°C (testemunha 5 g/L ácido L-málico (◆), 2 g/L ácido L-málico (◇), 5 g/L ácido L-málico (■) e 8 g/L ácido L-málico (▲)).

Verifica-se que a concentração de ácido L-málico é constante na ausência de ProMalic® e que a concentração inicial de ácido L-málico afecta o processo de desacidificação. Uma vez que o processo de fermentação é realizado com o auxílio das enzimas presentes na levedura, um aumento de concentração de substrato está associado a um aumento de actividade enzimática nesta gama de concentrações de ácido L-málico. Relativamente aos açúcares, verifica-se que a sua concentração se mantém praticamente constante ao longo do tempo tal como foi como descrito no subcapítulo 2.1.

**Tabela 5** - Valores médios iniciais e finais de pH, concentração de ácido L-málico e acidez total, velocidade de consumo de ácido L-málico e primeiro dia em que se observou turvação do meio para os ensaios realizados com mosto em que se estudou o efeito da concentração inicial de ácido L-málico.

[Ácido L-málico] <sub>inicial</sub> (g/L)	pH		[Ácido L-málico] (g/L)		A <sub>T</sub> (g/L ácido tartárico)		r <sub>0</sub> (g/L dia)	Turvação (dia)
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final		1º e 2º ensaio
Testemunha (5 g/L)	3,07	3,07	5,24	4,82	8,40	8,40	----	----
2	3,03	3,15	2,16	0,48	6,53	4,95	0,14	----;----
5	3,03	3,39	5,24	0,66	8,40	4,54	0,27	----;11
8	3,03	3,72	8,67	0,41	10,80	3,41	0,39	----;11

Ocorreu uma diminuição da acidez total presente no mosto uma vez que o seu valor está directamente relacionado com a concentração de ácido L-málico presente no meio, Tabela 5. Analisando o valor do pH, verificou-se um aumento relacionado com a diminuição da concentração do ácido L- málico, o que está de acordo com o descrito por Peynaud, 1993 e Silva *et al*, 2002.

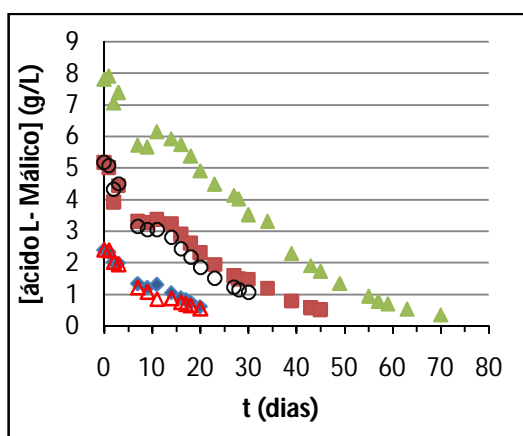


**Figura 18** – Evolução da velocidade de consumo de ácido L-málico em função da sua concentração.

Observando-se o gráfico da Figura 18, é possível confirmar que a reacção de consumo de ácido L-málico é de 1ª ordem.

### 2.3. Etanol

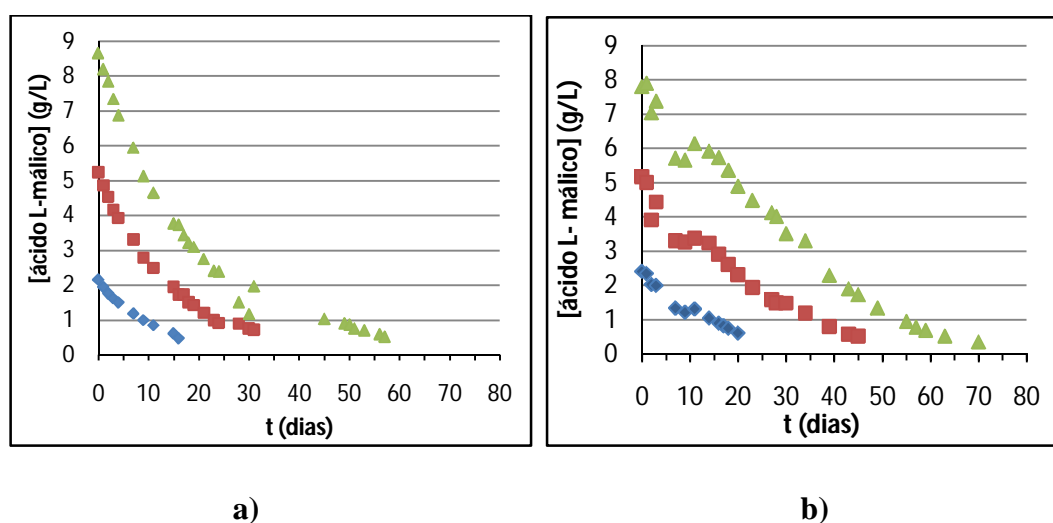
Durante o processo de fermentação maloalcoólica, o ácido L-málico é transformado em etanol e dióxido de carbono por acção da levedura *Schizosaccharomyces pombe* (Lepe et al, 1992). Sousa *et al* em 2005, concluiu que o etanol inibe o transporte de ácido L-málico na levedura *Schizosaccharomyces pombe*. De modo a avaliar a influência da concentração de etanol no processo de desacidificação através da utilização de leveduras *Schizosaccharomyces pombe* imobilizada em dupla camada de alginato, efectuou-se um estudo usando como meio a desacidificar vinho branco, no qual se variou a concentração de ácido L-málico (2, 5 e 8 g/L) e a temperatura (15 e 20°C). Para o ensaio realizado a 20°C, as concentrações em estudo foram de 2 e 5 g/L de ácido L-málico uma vez que estas são as concentrações mais comuns encontradas em vinhos. O vinho utilizado apresentava um grau alcoólico de 11,3% e uma concentração de açúcares residuais de 0,64 g/L. Os resultados obtidos relativamente ao estudo da influência da concentração de etanol encontram-se na Figura 19.



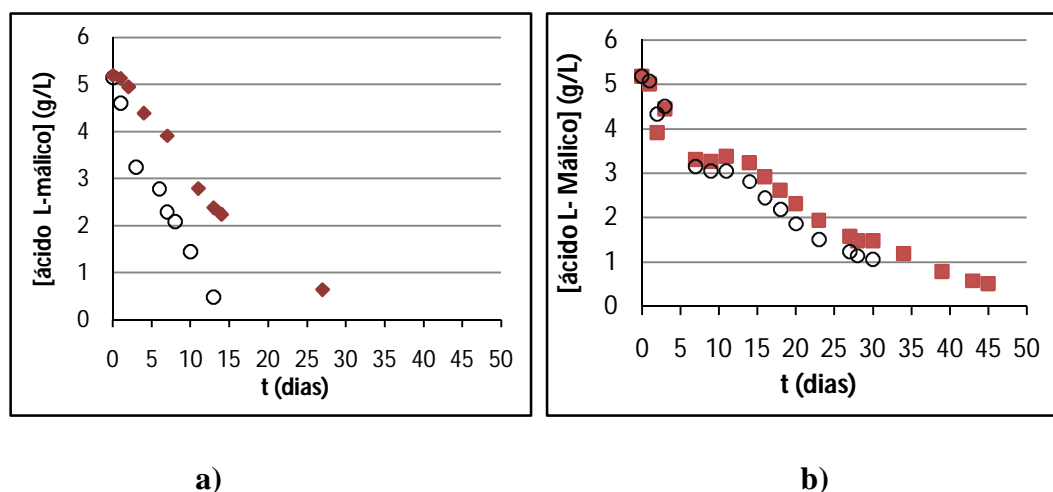
**Figura 19** – Perfis de concentração de ácido L-málico ao longo do processo de desacidificação de vinho realizado pelo ProMalic® com uma carga de 1 g/L em que se estudou o efeito do etanol variando a concentração de ácido L-málico e a temperatura (2 g/L de ácido L-málico a 15°C (◆) e a 20°C (▲); 5 g/L de ácido L-málico a 15°C (■) e a 20°C (○); 8 g/L de ácido L-málico a 15°C (▲)).

Pela análise da Figura 19, verificou-se que os ensaios realizados a 20°C apresentam um ligeiro aumento do consumo de ácido L-málico. Com o decorrer da experiência em que

se pretendia avaliar o efeito do etanol no processo de desacidificação, observou-se a ocorrência de turvação do meio em alguns dos ensaios (Tabela 6), a qual está relacionada com o aparecimento de leveduras do género *Saccharomyces*. As razões para tal ocorrência podem ser a sua presença no vinho ou a falta de esterilidade do ProMalic<sup>®</sup>. Dado que a levedura *Saccharomyces* utiliza o açúcar para a sua actividade e tendo em conta que o vinho apresenta uma concentração residual de açúcar, a levedura acaba por morrer, formando uma pequena camada no fundo do frasco.



**Figura 20** – Perfis de concentração de ácido L-málico ao longo do processo de desacidificação de mosto (a) e de vinho (b) realizado pelo ProMalic<sup>®</sup> com uma carga de 1 g/L a 15°C (2 g/L de ácido L-málico (◆); 5 g/L de ácido L-málico (■); 8 g/L de ácido L-málico (▲)).



**Figura 21** – Perfis de concentração de ácido L-málico ao longo do processo de desacidificação de mosto (a) e de vinho (b) realizado pelo ProMalic<sup>®</sup> com uma carga de 1 g/L e uma concentração inicial de ácido L-málico de 5 g/L a 15°C (■) e 20°C (○).

Analisando-se as duas figuras anteriores (Figuras 20 e 21), verifica-se que o consumo de ácido L-málico é mais rápido no ensaio realizado com mosto (sem etanol) do que no ensaio realizado com vinho para igual concentração inicial de ácido L-málico e temperatura, comprovando-se a existência de inibição do etanol sobre a levedura *Schizosaccharomyces pombe*, tal como concluiu Sousa *et al* em 2005.

**Tabela 6** – Valores médios iniciais e finais de pH, concentração de ácido L-málico, açúcares, acidez total, velocidade de consumo de ácido L-málico e respectivo primeiro dia em que se observou turvação do meio, para os ensaios realizados com vinho em que se estudou o efeito do etanol.

T (°C)	pH		[ácido L-málico]		[açúcares]		A <sub>T</sub>		r <sub>0</sub>	Turvação
			(g/L)		(g/L)		(g/L ácido tartárico)		(g/L dia)	(dia)
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final		1º e 2º ensaio
15	3,15	3,29	2,41	0,62	0,64	0,13	6,08	4,13	0,085	---;---
	2,98	3,27	5,18	0,52	0,64	0,06	9,30	3,83	0,097	43;43
	2,87	3,36	7,82	0,36	0,64	0,11	12,45	4,06	0,11	---;---
20	3,15	3,32	2,41	0,55	0,64	0,06	6,08	3,98	0,093	16; 20
	2,98	3,29	5,18	1,06	0,64	0,04	9,30	4,65	0,13	24;24

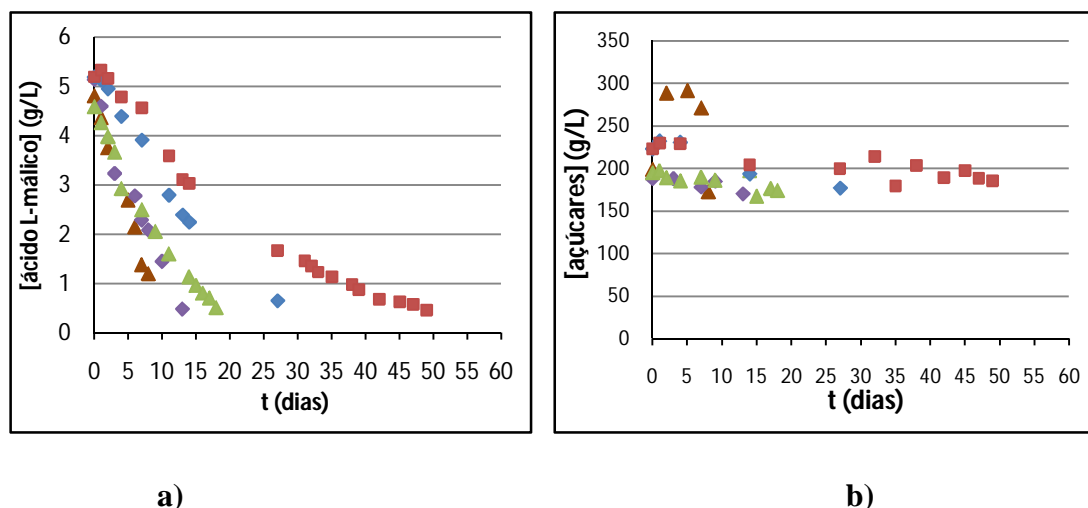
Pela análise dos resultados apresentados na Tabela 6, verifica-se um aumento do valor do pH interligado com a diminuição de acidez total. As explicações para tal ocorrência já foram referidas anteriormente. Na presença de etanol, também se verifica que a velocidade de consumo de ácido L-málico aumentou com o aumento da concentração inicial deste ácido. Para além disso, o aumento da temperatura de 15°C para 20°C promoveu o aumento da velocidade de consumo de ácido L-málico.

## 2.4. Temperatura

### 2.4.1. *Schizosaccharomyces pombe* imobilizada

Avaliou-se o efeito da temperatura no processo de desacidificação do mosto, pelo que se efectuaram ensaios a 10, 15, 18, 20 e 22°C apresentando-se os resultados obtidos na Figura 22.





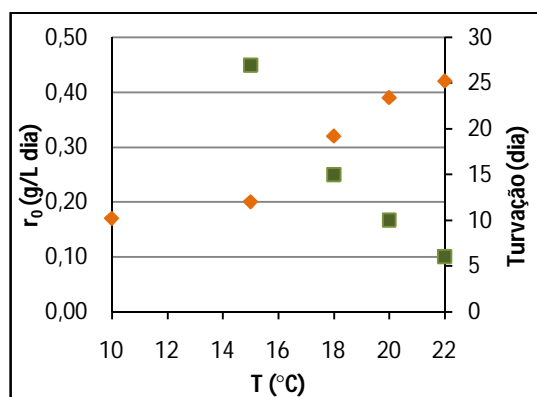
**Figura 22** – Perfis de concentração de ácido L-málico (a) e de açúcares (b) ao longo do processo de desacidificação de mosto realizado pelo ProMalic® com uma carga de 1 g/L a diferentes temperaturas (22°C (▲), 20°C (◆), 18°C (▲), 15°C (◆) e 10°C (■)).

Analisando a Figura 22 (a), verifica-se que a temperatura afecta a velocidade de consumo de ácido L-málico uma vez que quanto maior for a temperatura, maior é o consumo do ácido L-málico. Normalmente quanto mais elevada for a temperatura, desde que não se ultrapasse a temperatura óptima, maior será a actividade das leveduras proporcionando um maior consumo do substrato; observa-se que a reacção torna-se muito lenta a baixas temperaturas. Mais uma vez, constata-se que a levedura *Schizosaccharomyces pombe* não consome o açúcar durante o processo de fermentação, Figura 22 (b).

**Tabela 7** – Valores médios iniciais finais de pH, concentração de ácido L-málico, acidez total, velocidade de consumo de ácido L-málico e primeiro dia em que se observou turvação do meio para os ensaios realizados com mosto em que se estudou o efeito da temperatura.

T (°C)	pH		[ácido L-málico] (g/L)		A <sub>T</sub> (g/L ácido tartárico)		r <sub>0</sub> (g/L dia)	Turvação (dia)
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final		1º e 2º ensaio
22	3,03	3,28	4,82	0,91	8,70	5,06	0,42	5 ; 7
20	3,01	3,32	5,14	0,49	8,93	4,95	0,39	10; 10
18	3,03	3,41	4,60	0,51	9,30	4,95	0,32	13 ; 17
15	3,04	3,39	5,19	0,65	10,05	4,43	0,20	27 ; 27
10	3,04	3,51	5,19	0,46	10,05	3,98	0,17	---; ---

Verifica-se mais uma vez um aumento do valor do pH interligado com a diminuição de acidez total. A temperatura influencia o aparecimento de turvação, uma vez que quanto maior for a temperatura, mais rápida será a ocorrência de turvação do meio. A razão para tal ocorrência prende-se com o facto de a temperatura acelerar o processo de multiplicação das leveduras e, no caso da dupla camada de alginato apresentar alguma fissura, estas libertam-se para o meio.



**Figura 23** – Evolução da velocidade de consumo de ácido L-málico pela levedura *Schizosaccharomyces pombe* e o dia (valor médio) em que se observou o aparecimento de turvação do meio em função da temperatura ( $r_0$  (◆), Turvação(■)).

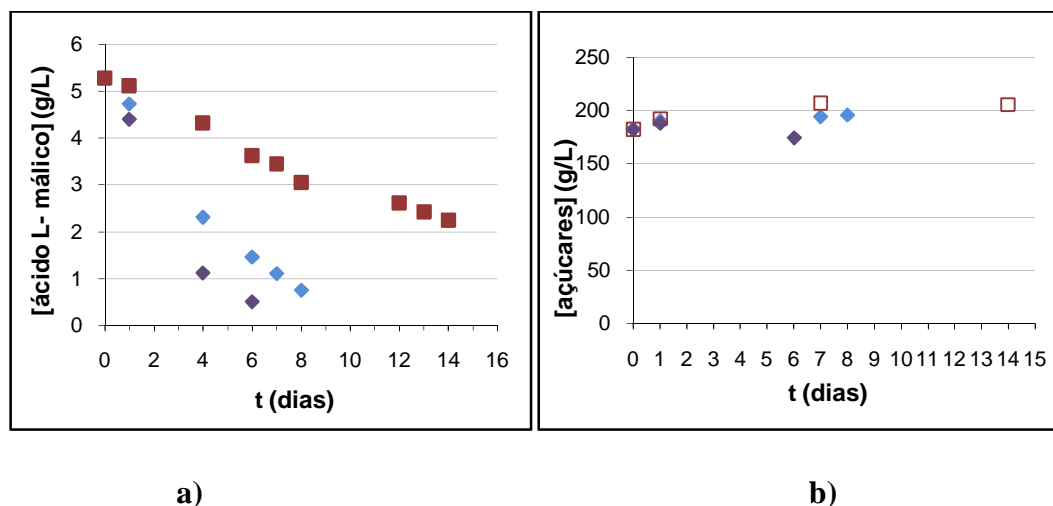
Analisando a Figura 23, verifica-se que ao aumento da temperatura está associado um aumento da velocidade de degradação do ácido L-málico, que segue forma de uma curva sinusoidal e simultaneamente um aparecimento cada vez mais rápido de turvação pela *Schizosaccharomyces pombe*.

#### 2.4.2. *Schizosaccharomyces pombe* livre

O objectivo principal deste estudo foi avaliar o efeito da temperatura no processo de desacidificação do mosto e comparar a velocidade de consumo de ácido L-málico para o caso da levedura se encontrar livre ou imobilizada. Assim, seguiu-se o processo de desacidificação do mosto utilizando a *Schizosaccharomyces pombe* na forma livre com uma concentração de  $1 \times 10^6$  células/mL a diferentes temperaturas e os resultados obtidos encontram-se na Figura 24.

Mais uma vez (Figura 24), tal como acontece nos ensaios realizados com a levedura imobilizada (subcapítulo 2.4.1), observa-se que a 20°C o consumo de ácido L-málico é mais rápido do que a 15°C ou a 10°C, pelo que se pode concluir que a velocidade de

consumo de ácido L-málico é tanto maior quanto maior for a temperatura. A Figura 24 (b) permite mais uma vez verificar que não há consumo de açúcares por parte da levedura durante o processo de desacidificação do mosto.

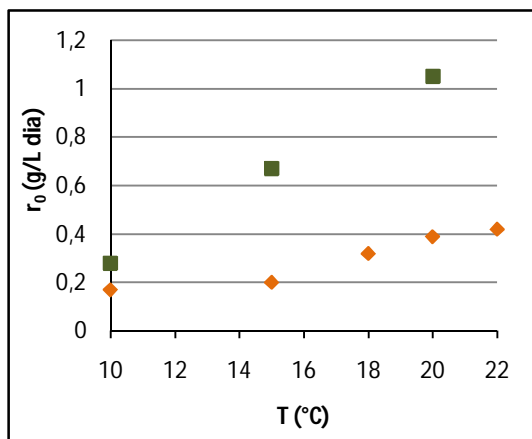


**Figura 24** – Perfis de concentração de ácido L-málico (a) e de açúcares (b) ao longo do processo de desacidificação de mosto realizado pela levedura *Schizosaccharomyces pombe* na forma livre a diferentes temperaturas (20°C (◆), 15°C (◆) e 10°C (□)).

**Tabela 8** – Valores médios iniciais e finais de pH, concentração de ácido L-málico, acidez total e velocidade de consumo de ácido L-málico em que se estudou o efeito da temperatura na desacidificação de mosto pela levedura *Schizosaccharomyces pombe* na forma livre.

T (°C)	pH		[ácido L-málico]		$A_T$		$r_0$
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	(g/L dia)
20	3,04	3,28	5,28	0,51	8,40	4,84	1,05
15	3,04	3,39	5,28	0,75	8,40	4,65	0,67
10	3,04	3,51	5,28	2,25	8,40	6,11	0,28

Mais uma vez, os resultados obtidos na Tabela 8 mostram a tendência de aumento do valor de pH com o processo de desacidificação, estando interligado com a diminuição da acidez do mosto que por sua vez está associada à redução da concentração de ácido L-málico.



**Figura 25** – Evolução velocidade de degradação de ácido L-málico em função da temperatura no processo de desacidificação de mosto realizado pela levedura *Schizosaccharomyces pombe* na forma livre (■) e na forma imobilizada (◆).

Analisando a Figura 25, verifica-se um aumento da velocidade de consumo do ácido L-málico com o aumento da temperatura quer a levedura *Schizosaccharomyces pombe* esteja livre ou imobilizada, embora a velocidade de consumo do ácido L-málico seja superior à mesma temperatura para o caso da levedura estar na forma livre; esse aumento da velocidade de consumo está associado ao facto de não apresentar limitações difusionais de transferência de massa devido à presença da dupla camada de alginato e ao facto da levedura se poder multiplicar livremente no mosto.

### 3. Energia de activação do processo de desacidificação

O objectivo desta etapa do estudo consistiu na determinação da energia mínima necessária para que ocorra o processo de desacidificação do mosto, energia de activação ( $E_a$ ). De modo comparativo, efectuaram-se ensaios a diferentes temperaturas utilizando a levedura *Schizosaccharomyces pombe* na forma imobilizada e livre. Uma vez que as curvas apresentam um decaimento exponencial de 1ª ordem, a constante de velocidade para uma dada temperatura é determinada pela equação (28).

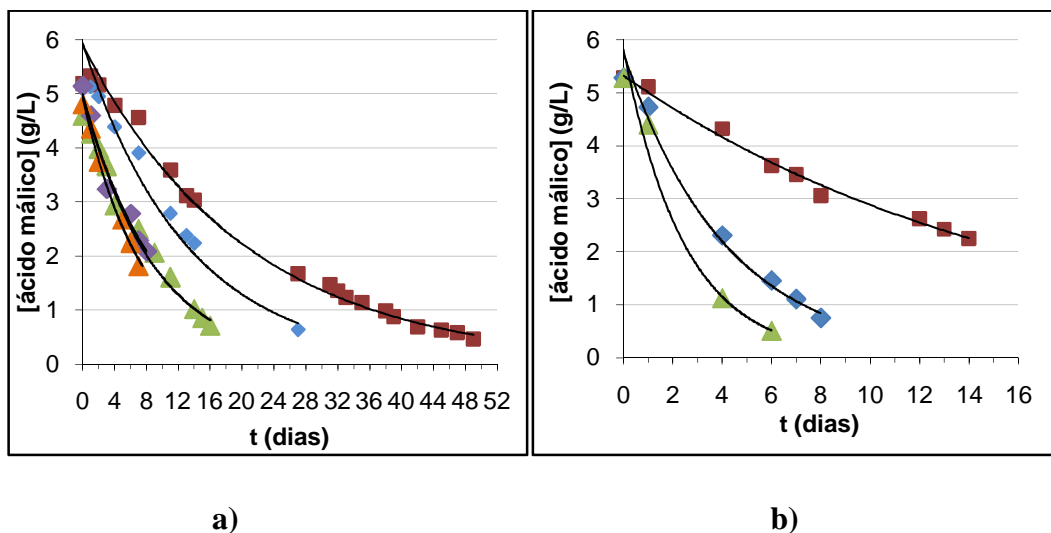
$$C_A = C_{A_0} e^{(-kt)} \quad (28)$$

A energia de activação é determinada segundo a equação de Arrhenius (Fogler, 1992). Este modelo considera que a constante de velocidade varia exponencialmente com o inverso da temperatura, equação 29.

$$k = A e^{\left(-\frac{E_a}{RT}\right)} \quad (29)$$

onde  $k$  ( $\text{dia}^{-1}$ ) é a constante de velocidade à temperatura  $T$  (K),  $E_a$  (J/mol) é a energia de activação,  $R$  é a constante dos gases perfeitos (8,314 J/mol.K) e  $A$  ( $\text{dia}^{-1}$ ) é o factor pré exponencial.

Para estimar o valor dos parâmetros relativos à equação de Arrhenius, foi necessário efectuar a representação gráfica da equação 28 para cada um dos ensaios realizados isotermicamente através de uma regressão exponencial (Figura 26), determinando-se a constante de velocidade para as diferentes temperaturas, Tabela 9. A energia de activação foi determinada através da linearização da equação de Arrhenius, equação 29, quer para o caso da *Schizosaccharomyces pombe* estar na forma imobilizada ou livre, Tabela 9.



**Figura 26** – Perfis de concentração de ácido L-málico e linhas representativas de um ajuste exponencial de primeira ordem determinar a constante cinética do processo para a levedura *Schizosaccharomyces pombe* imobilizada (a) e na forma livre (b) a 22°C (▲), 20°C (◆), 18°C (▲), 15°C (◆) e 10°C (■).

**Tabela 9** – Valores da constante cinética, energia de activação e respectivo coeficiente de correlação para as temperaturas de 22, 20, 18, 15 e 10°C para o ensaio realizado com mosto e levedura *Schizosaccharomyces pombe* imobilizada e livre.

T (°C)	Imobilizada		Livre	
	k (dia <sup>-1</sup> )	coeficiente de correlação	k (dia <sup>-1</sup> )	coeficiente de correlação
22	0,13	0,989	---	---
20	0,10	0,973	0,40	0,993
18	0,11	0,982	---	---
15	0,07	0,976	0,24	0,990
10	0,04	0,991	0,06	0,991
Ea ± intervalo de confiança a 95% (kcal/ mol)		16 ± 2	31 ± 8	
coeficiente de correlação		0,946	0,940	

O valor de energia de activação apresentado na literatura para a desacidificação de um meio sintético pela levedura *Schizosaccharomyces pombe* livre é de 26 kcal/mol (Taillandier, 1990). Como conclusão geral, verifica-se que a energia de activação da levedura *Schizosaccharomyces pombe* na forma livre é semelhante ao valor da literatura. A energia de activação da levedura *Schizosaccharomyces pombe* imobilizada em dupla camada de alginato é inferior à energia de activação da levedura na forma livre, uma vez que para o caso da levedura imobilizada, ocorre um gasto de energia com a transferência de substrato para o interior da esfera, antes de ocorrer difusão e reacção em simultâneo enquanto no caso da levedura livre, o processo é de difusão e reacção simultâneo (Figueiredo, 1987).

#### 4. Desacidificação de mosto num fermentador de leito fixo com reciclo total

O objectivo principal desta etapa do estudo foi a possibilidade de implementação da montagem realizada em adegas, de modo a facilitar o processo de desacidificação levada a cabo pela levedura *Schizosaccharomyces pombe* imobilizada em dupla camada de alginato.

Neste estudo, avaliou-se o efeito da concentração do ácido L-málico, carga de ProMalic<sup>®</sup>, caudal de recirculação e o efeito da presença da levedura *Saccharomyces cerevisiae* no processo de desacidificação biológica realizada pelo ProMalic<sup>®</sup>. Posteriormente, compararam-se os resultados obtidos no fermentador de leito fixo com reciclo total e os ensaios realizados em *batch*. Os ensaios foram terminados quando se verificou a ocorrência de turvação devido à presença da levedura *Saccharomyces*

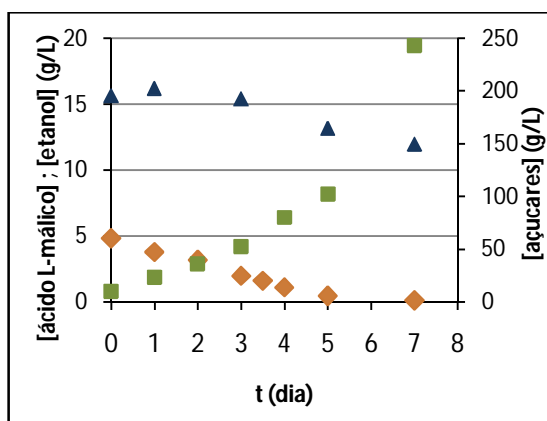
(observada recorrendo a um microscópio) ou quando a concentração de ácido L-málico era inferior a 0,5 g/L.

O balanço de material correspondente ao substrato para um biorreactor é dado pela equação 30 (Fogler, 1992):

$$\begin{bmatrix} \text{velocidade de} \\ \text{acumulação} \\ \text{de substrato} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \text{Fluxo molar} \\ \text{que entra} \\ \text{no sistema} \end{bmatrix} - \begin{bmatrix} \text{Fluxo molar} \\ \text{que sai} \\ \text{do sistema} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} \text{velocidade de geração} \\ \text{de substrato dentro} \\ \text{do sistema} \end{bmatrix} \quad (30)$$

#### 4.1. Análises efectuadas à concentração de etanol utilizando a técnica de HPLC

Durante o processo de fermentação maloalcoólica, foram realizadas análises à concentração de etanol, de ácido L-málico e de açúcares encontrando-se os resultados obtidos na Figura 27.



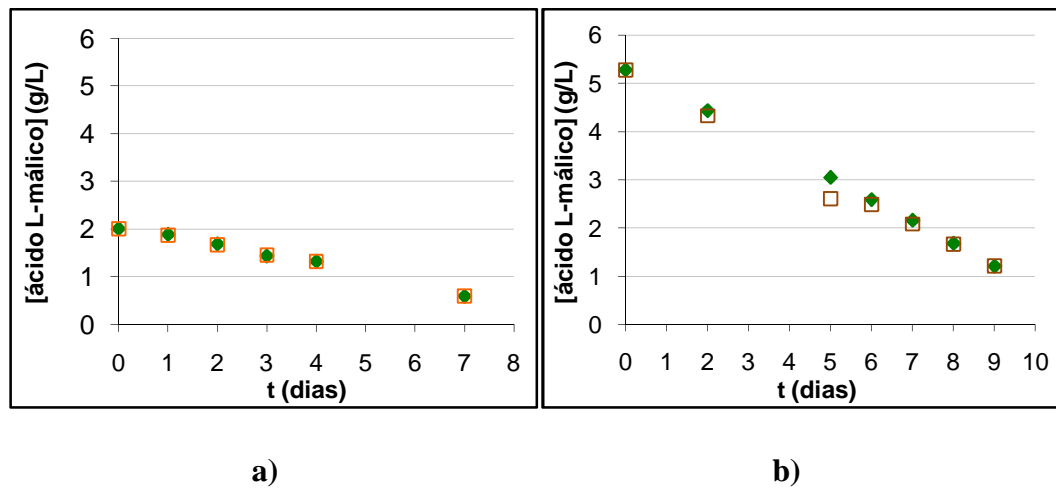
**Figura 27** – Perfis de concentração de ácido L-málico, etanol e de açúcares ao longo do processo de fermentação maloalcoólica de mosto no fermentador de leito fixo com reciclo total (ácido L-málico (◆); etanol (■) e açúcares (▲)).

Analisando a Figura 27, verifica-se que em simultâneo ao consumo de ácido L-málico ocorre o aumento da concentração de etanol (fermentação maloalcoólica). O ligeiro decréscimo da concentração de açúcares deve-se à ocorrência de turvação no sétimo dia associada ao aparecimento de levedura do género *Saccharomyces* no meio. Por outro lado, verifica-se um aumento acentuado da concentração de etanol nos últimos dias do processo de desacidificação; esse aumento está associado à transformação do ácido L-málico em etanol pela levedura *Schizosaccharomyces pombe* e pela transformação de açúcares em etanol pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* (fermentação alcoólica) (Delanoe *et al*, 1997; Ferreira *et al*, 2008).

#### 4.2. Ácido L-málico

Neste estudo, avaliou-se o efeito da concentração do ácido L-málico na desacidificação biológica do mosto, tendo sido realizados ensaios com uma concentração inicial na ordem de 2 e 5 g/L de ácido L-málico, concentrações comuns encontradas em mostos e vinhos.

A concentração do ácido L-málico ao longo do processo de desacidificação biológica foi determinada à entrada e saída do fermentador, verificando-se que as concentrações de ácido L-málico à entrada e à saída do fermentador são iguais, Figura 28.



**Figura 28** – Evolução da concentração de ácido L-málico no processo de desacidificação de mosto pelo ProMalic® com uma carga de 1 g/L num fermentador de leito fixo com reciclo total com uma concentração inicial de ácido L-málico de 2 g/L (a) e 5 g/L (b) e um caudal de recirculação de aproximadamente 100 mL /min a 15°C (entrada do fermentador (◆) e saída do fermentador (□)).

O balanço de material do substrato é representado pelas equações 31 a 33 (Fogler, 1992).

$$F_A - F_{A0} - r_{Aw} \times W_{cat} = \frac{dN_A}{dt} \quad (31)$$

$$-r_{Aw} \times \frac{W_{cat}}{V} = \frac{dC_A}{dt} \quad (32)$$

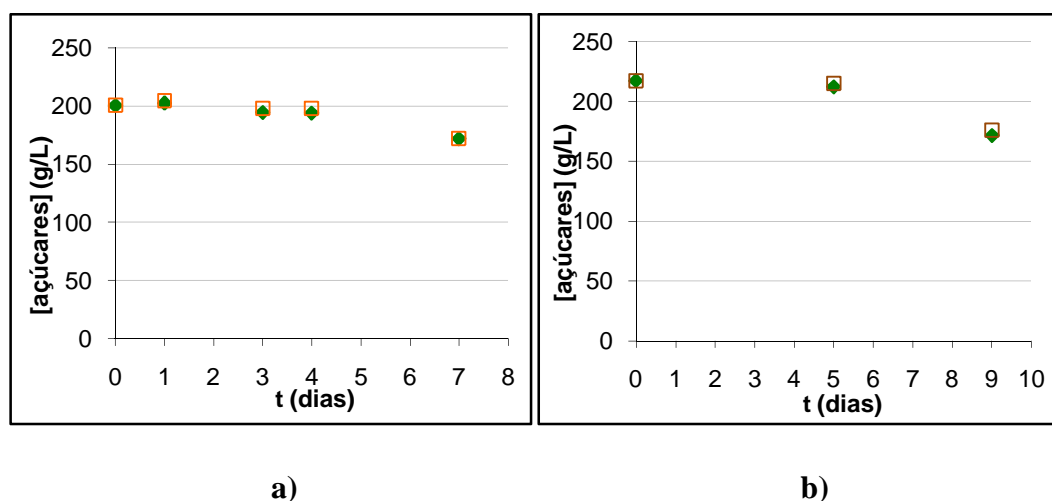
$$-r_{AV} = \frac{dC_A}{dt} \quad (33)$$

onde  $F_A$  (g/s) corresponde ao fluxo mássico de substrato à saída do fermentador;  $F_{A0}$  (g/s) corresponde ao fluxo mássico de substrato à entrada do fermentador;  $r_{Aw}$  ( $s^{-1}$ ) é a



velocidade por massa de catalisador;  $W_{cat}$  (g) é a massa de biocatalisador e  $r_{AV}$  (g/Ls) é a velocidade do substrato por unidade de volume.

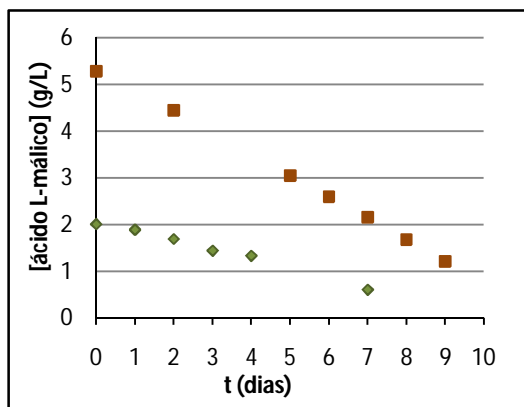
Tal como nos ensaios realizados em descontínuo, representou-se graficamente a concentração de açúcares ao longo do processo de desacidificação, de modo a verificar se houve consumo de açúcares pela levedura *Schizosaccharomyces pombe*, Figura 29.



**Figura 29** – Perfis de concentração de açúcares ao longo do processo de desacidificação de mosto no fermentador de leito fixo com reciclo total realizado, com uma concentração inicial de ácido L-málico de 2 g/L (a) e 5 g/L (b) com um caudal de 100 mL /min e uma carga de 1 g/L de ProMalic® a 15°C (entrada do fermentador (◆) e saída do fermentador (□)).

Relativamente à concentração de açúcares (frutose e glucose) presente no mosto, verifica-se que esta se mantém constante excepto no dia em que o ensaio foi terminado devido à presença de turvação provocada pela levedura do género *Saccharomyces*. Enquanto a levedura *Schizosaccharomyces pombe* não consome os açúcares durante o processo de fermentação, a levedura do tipo *Saccharomyces* utiliza o açúcar como substrato quer para crescer quer para realizar a fermentação alcoólica (Gayon *et al*, 1998).

Pela análise da Figura 30, verifica-se que a concentração de substrato afecta a velocidade de consumo de ácido L-málico tal como nos ensaios realizados em descontínuo, estando as razões para tal ocorrência descritas no subcapítulo 2.2. Logo, conclui-se que a levedura *Schizosaccharomyces pombe* imobilizada apresenta sensibilidade relativamente à concentração de ácido L-málico.



**Figura 30** – Perfis de concentração de ácido L-málico ao longo do processo de desacidificação de mosto levada a cabo pelo ProMalic® (com uma carga de 1 g/L) com uma concentração inicial de ácido L-málico de 2 g/L (◆) e 5 g/L (■) e um caudal de recirculação na ordem de 100 mL/min. a 15°C.

**Tabela 10** – Valores médios iniciais e finais de pH, concentração de ácido L-málico, acidez total e velocidade de consumo de ácido L-málico no ensaio realizado com mosto em que se estudou o efeito da concentração inicial de ácido L-málico.

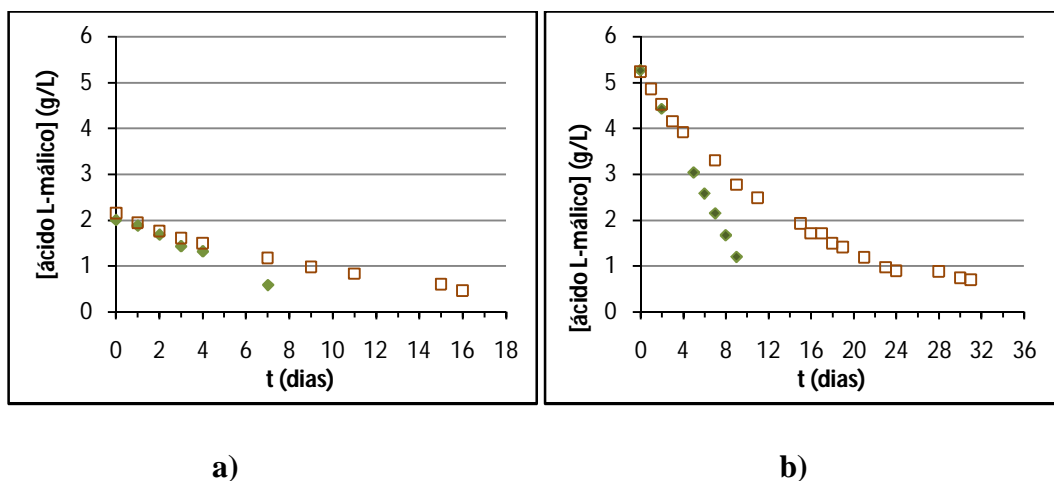
[ácido L-málico] (g/L)	pH		[ácido L-málico] (g/L)		A <sub>T</sub> (g/L ácido tartárico)		r <sub>0</sub> (g/L dia)
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	
2	3,03	3,10	2,01	1,33	6,83	6,15	0,18
5	3,04	3,26	5,28	1,68	8,40	5,55	0,45

Analizando os resultados obtidos na Tabela 10, verifica-se mais uma vez um aumento do valor de pH, que está ligado a uma diminuição da acidez total presente no mosto.

Com o intuito de comparar os resultados obtidos no processo de desacidificação realizado em descontínuo com os do fermentador de leito fixo com reciclo total, representaram-se os resultados obtidos na Figura 31.

Analizando a Figura 31, verifica-se que o consumo de ácido L-málico em condições semelhantes é mais rápido nos ensaios realizados com o fermentador de leito fixo com reciclo total. Isto pode estar relacionado com o facto de o mosto não estar estagnado; deste modo, a camada de filme formado em torno das esferas de alginato e à superfície da levedura diminui (apesar da camada de alginato funcionar como limitação para a

transferência de massa) facilitando a difusão do substrato para o interior da dupla camada de alginato e posteriormente para o interior da levedura.

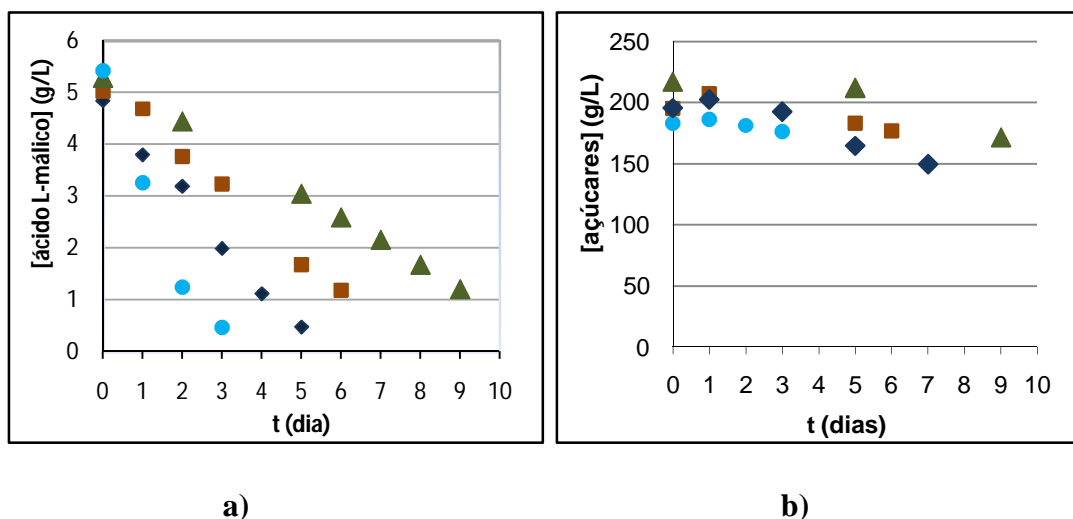


**Figura 31** – Comparação das curvas de consumo de ácido L-málico no processo de desacidificação de mosto no fermentador de leito fixo com reciclo total (◆) e em *batch* (□) a 15°C com uma concentração inicial de ácido L-málico de 2 g/L (a) e 5 g/L de ácido L-málico (b).

#### 4.3. Carga de ProMalic®

Com o objectivo de estudar o efeito da carga de ProMalic® contida no reactor no processo de desacidificação do mosto, realizaram-se ensaios com diferentes cargas de ProMalic® (1, 2, 5 e 10 g/L), encontrando-se os resultados obtidos na Figura 32. Tal como se verificou no ensaio com uma carga de ProMalic® de 1 g/L (subcapítulo 4.2, Figura 28), também não se verificam diferenças significativas da concentração de ácido L-málico à entrada e à saída do fermentador pelo que se pode considerar que o sistema opera em descontínuo (*batch*) para os ensaios realizados com uma carga de 5 g/L e 10 g/L de ProMalic® (Figura H.1 do Anexo).

Analisando o gráfico da Figura 32, constata-se que à medida que se aumenta a carga de ProMalic®, aumenta o consumo de ácido L-málico; tal ocorrência deve-se ao facto de haver um maior número de leveduras com o aumento da carga de ProMalic®. Nos ensaios com carga de 1 e 2 g/L de ProMalic®, verifica-se um ligeiro consumo de açúcares possivelmente devido à presença da levedura do género *Saccharomyces* no meio.

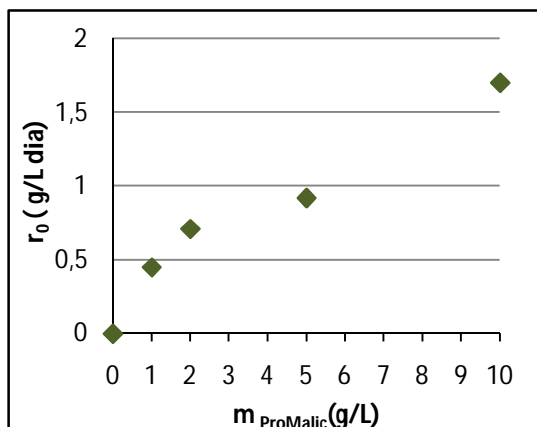


**Figura 32** – Perfis de concentração de ácido L-málico (a) e de açúcares (b) no processo de desacidificação de mosto no fermentador de leito fixo com reciclo total a 15°C para diferentes cargas de ProMalic® (1 g/L ProMalic® (▲), 2 g/L ProMalic® (■), 5 g/L ProMalic® (◆) e 10 g/L ProMalic® (●)).

**Tabela 11** – Valores iniciais e finais de pH, concentração de ácido L-málico, acidez total e velocidade de consumo de ácido L-málico no ensaio realizado com mosto em que se estudou o efeito da carga de ProMalic® no fermentador de leito fixo com reciclo total.

m <sub>ProMalic</sub> (g/L)	pH		[ácido L-málico] (g/L)		A <sub>T</sub> (g/L ácido tartárico)		r <sub>0</sub> (g/L día)
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	
1	3,04	3,23	5,28	1,21	8,40	5,48	0,47
2	3,03	3,33	5,02	1,19	8,25	5,33	0,71
5	3,02	3,36	4,84	0,48	8,55	4,65	0,89
10	3,03	3,42	5,42	0,43	8,85	4,95	1,70

Analisando os resultados obtidos na tabela 11, verifica-se um aumento de pH, que está relacionado com a diminuição da acidez presente no mosto. Relativamente à velocidade de consumo de ácido L-málico, verifica-se que esta aumenta com o aumento da carga de ProMalic®, embora este aumento não seja directamente proporcional (isto é, não é de 1:1), Tabela 11 e Figura 33.



**Figura 33** – Variação da velocidade de consumo de ácido L-málico em função da carga de ProMalic® a 15°C no fermentador de leito fixo com reciclo total.

A optimização da montagem experimental possibilitou a medição do caudal e consequente determinação do tempo de residência ( $\tau$ ) (equação 34) e da taxa de diluição ( $D$ ) (equação 35) (Fogler, 1992; Fonseca *et al*, 2001), tabela 12.

$$\tau = \frac{V_{\text{react}}}{Q} \quad (34)$$

$$D = \frac{Q}{V_{\text{react}}} = \frac{1}{\tau} \quad (35)$$

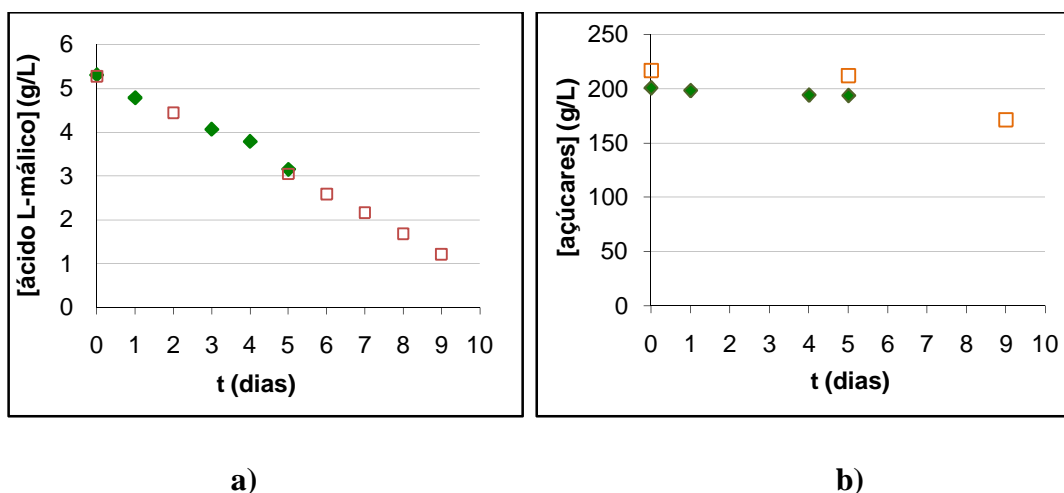
**Tabela 12** – Valores de caudal de recirculação, altura do leito, tempo de residência e taxa de diluição para o ensaio com cargas de 2, 5 e 10 g/L de ProMalic®.

m <sub>ProMalic</sub> (g/L)	t (dia)	Q (cm <sup>3</sup> /min)	h <sub>leito</sub> (cm)	$\tau$ (min)	D (min <sup>-1</sup> )
2	0	80	4,33	0,40	2,53
	1	92	4,33	0,34	2,92
	2	80	5,07	0,46	2,16
	6	67	6,40	0,70	1,43
5	0	92	7,13	0,79	1,26
	1	100	8,10	0,83	1,20
	2	100	8,07	0,83	1,21
	3	100	8,53	0,88	1,14
	4	100	8,93	0,92	1,09
	7	100	10,77	1,11	0,90
10	0	86	15,80	1,90	0,53
	1	100	16,40	1,69	0,59
	2	92	16,83	1,88	0,53
	3	92	16,87	1,88	0,53
	4	92	17,17	1,91	0,52

Pela análise dos resultados da tabela 12, observa-se um aumento da altura do leito ao longo do processo de desacidificação, estando esse aumento associado à reprodução das leveduras *Schizosaccharomyces pombe* no interior da dupla camada de alginato. Também se observa um aumento do tempo de residência, relacionado com o aumento da altura do leito e com a diminuição do caudal.

#### 4.4. Caudal de recirculação

Nesta parte do estudo, avaliou-se o efeito do caudal de recirculação no processo de desacidificação biológica, tendo sido efectuados ensaios com um caudal na ordem de 100 e 257 mL/min e os resultados obtidos encontram-se na Figura 34.



**Figura 34** – Perfis de concentração de ácido L-málico (a) e de açúcares (b) no processo de desacidificação de mosto no fermentador de leito fixo com reciclo total a 15°C com carga de ProMalic® 1 g/L e um caudal na ordem de 100 mL/min (□) e 257 mL/min (◆).

Analizando a Figura 34, verifica-se que o aumento de caudal não influencia a velocidade de degradação do ácido L-málico; tal facto demonstra que as limitações difusionais externas à transferência de massa não são significativas (Figueiredo, 1987). Relativamente à concentração de açúcares presente no meio, verifica-se mais uma vez que a levedura *Schizosaccharomyces pombe* não o consumiu durante a desacidificação, excepto no ensaio realizado para um caudal na ordem de 100 mL/min no qual se verificou uma ligeira diminuição da sua concentração devido à presença da levedura do tipo *Saccharomyces* comprovada pelo aparecimento de turvação do meio.

**Tabela 13** - Valores iniciais e finais de pH, concentração de ácido L-málico, acidez total e velocidade consumo de ácido L-málico no ensaio realizado com mosto em que se estudou o efeito do caudal de recirculação no processo de desacidificação do mosto.

Q (cm <sup>3</sup> /min)	pH		[ácido L-málico]		A <sub>T</sub>		r <sub>0</sub>
			(g/L)		(g/L ácido tartárico)		(g/L dia)
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	
100	3,04	3,26	5,28	1,68	8,40	5,55	0,45
257	3,03	3,12	5,30	3,15	8,85	7,50	0,40

Pela análise dos resultados da tabela 13, verifica-se um aumento de pH, associado à diminuição da acidez presente no mosto tal como nos ensaios anteriores. Relativamente à velocidade de consumo de ácido L-málico, verifica-se uma diminuição pouco significativa da velocidade de degradação do ácido L-málico com o aumento do caudal.

**Tabela 14** - Valores da altura do leito, do tempo de residência e taxa de diluição para o ensaio realizado com mosto e um caudal de 257 mL/min.

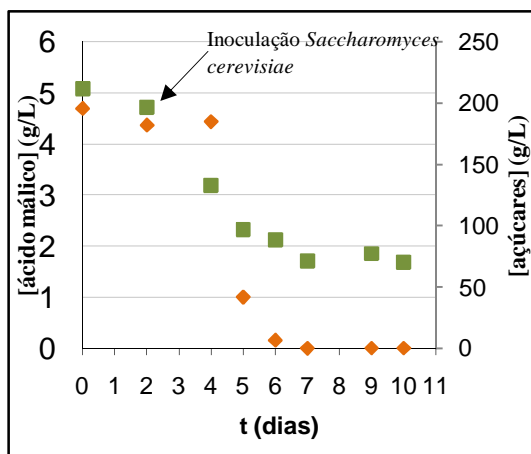
Q (cm <sup>3</sup> /min)	t (dia)	h <sub>leito</sub> (cm)	τ (s)	D (min <sup>-1</sup> )
257	0	2,17	3,39	16,25
	1	2,17	3,39	16,25
	4	2,47	4,20	14,28
	5	2,93	5,00	12,00

Analisando os resultados apresentados na Tabela 14, verifica-se a diminuição da taxa de diluição associado ao aumento do tempo de residência que por sua vez está associado ao aumento da altura do leito.

#### 4.5. Interação entre as leveduras *Schizosaccharomyces pombe* e *Saccharomyces cerevisiae*

A última etapa do estudo consistiu na verificação das consequências resultantes da interação entre as leveduras *Schizosaccharomyces pombe* e *Saccharomyces cerevisiae*. De acordo com Taillandier *et al* (1995) e Strehaiano (2001), a acção da *Schizosaccharomyces pombe* é inibida pela acção da *Saccharomyces cerevisiae* e não existe necessidade de remover a *Schizosaccharomyces pombe* do meio para parar o processo de desacidificação,

sendo apenas necessário adicionar a *Saccharomyces cerevisiae*. Para testar o efeito inibidor da *Saccharomyces cerevisiae*, efectuou-se um ensaio no qual existia *Schizosaccharomyces pombe* no meio durante os dois primeiros dias de fermentação. Decorridos estes dois dias, inoculou-se a *Saccharomyces cerevisiae* no meio para se poder cumprir o objectivo deste ensaio. Os resultados deste ensaio, terminado devido à acumulação de dióxido de carbono provocando a paragem da bomba, encontram-se na Figura 35.



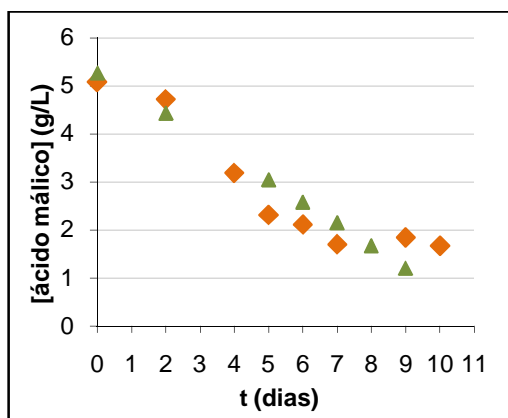
**Figura 35** – Perfis de concentração de ácido L-málico (■) e de açúcares (◆) no fermentador de leito fixo com reciclo total a 15°C com 1 g/L de ProMatic® em que se estudou o efeito da presença da levedura *Saccharomyces cerevisiae* no processo de desacidificação do mosto.

Pela análise da Figura 35, observa-se que ocorre consumo de ácido L-málico pela acção da levedura *Schizosaccharomyces pombe*, tal como nos ensaios anteriormente realizados, e que não há consumo de açúcares nos dois primeiros dias de fermentação. Após a inoculação da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, observa-se que o consumo de açúcares só ocorre dois dias após a sua inoculação. A razão plausível pode passar pela fase “lag”, período em que não só se adaptou às novas condições do meio como também deve ter sofrido uma possível inibição ou competição por parte da *Schizosaccharomyces pombe*. No período final do ensaio, verifica-se uma ligeira estabilização no consumo de ácido L-málico pela levedura *Schizosaccharomyces pombe* o que permite concluir que a levedura *Saccharomyces cerevisiae* tem um efeito inibidor sobre a levedura *Schizosaccharomyces pombe*.

De modo a avaliar a influência da levedura *Saccharomyces cerevisiae* no processo de desacidificação biológica realizada pela levedura *Schizosaccharomyces pombe* imobilizada



em dupla camada de alginato, representaram-se graficamente os ensaios realizados em condições semelhantes com e sem adição de *Saccharomyces cerevisiae*, Figura 36.



**Figura 36** – Perfis de concentração de ácido L-málico ao longo do processo de desacidificação do mosto no fermentador de leito fixo com reciclo total a 15°C realizado com ProMalic® (▲) e com ProMalic® em interacção com *Saccharomyces cerevisiae* (◆).

Analisando a Figura 36, verifica-se um consumo semelhante de ácido L-málico no período inicial do ensaio embora a partir do sétimo dia, exista uma tendência para estabilizar no ensaio com ProMalic® em interacção com *Saccharomyces cerevisiae*. No entanto, a curva de consumo no ensaio realizado apenas com ProMalic® tem tendência a diminuir. Tendo em conta estes dados, conclui-se que ocorre inibição da *Saccharomyces cerevisiae* sobre a actividade do ProMalic®.

**Tabela 15** – Valores iniciais e finais de pH, concentração de ácido L-málico, acidez total e velocidade de consumo de ácido L-málico no ensaio em que se estudou o efeito da *Saccharomyces cerevisiae* no processo de desacidificação do mosto levada a cabo pelo ProMalic®.

Ensaio	pH		[ácido L-málico] (g/L)		A <sub>T</sub> (g/L ácido tartárico)		r <sub>0</sub> (g/L dia)
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	
Interacção das leveduras	3,04	3,19	5,08	1,68	8,63	6,90	0,53

Tal como nos ensaios anteriores, verifica-se um ligeiro aumento do valor de pH associado à diminuição da concentração de ácido L-málico e consequente diminuição da acidez total do mosto desacidificado.

---

## **Capítulo IV**

### **Conclusões/ Sugestões para Trabalho Futuro**

### Conclusões:

Este trabalho demonstrou que o ProMalic<sup>®</sup>, designação comercial para a levedura *Schizosaccharomyces pombe* imobilizada em dupla camada de alginato, é capaz de transformar o ácido L-málico em etanol pelo processo de fermentação maloalcoólica.

Face às diferentes composições que o vinho/mosto podem conter, estudou-se a influência de alguns parâmetros essenciais à qualidade do vinho em ensaios realizados em *batch* tendo-se observado que:

- (i) Não foi possível estabelecer uma relação entre a concentração de anidrido sulfuroso e a velocidade de degradação do ácido L-málico.
- (ii) A velocidade de degradação do ácido L-málico aumenta com a sua concentração.
- (iii) Com o aumento da temperatura, a velocidade de degradação do ácido L-málico aumenta.
- (iv) O etanol tem um efeito inibidor no processo de desacidificação.

Duas das conclusões aplicáveis a todos os ensaios efectuados foram:

- (i) O ProMalic<sup>®</sup> não consome os açúcares durante o processo de desacidificação, uma vez que a sua concentração se manteve praticamente constante.
- (ii) A diminuição da acidez total está associada a um aumento do pH.

Ao efectuar um ensaio para comparar a energia de activação referida na literatura (26 kcal/mol) com a obtida experimentalmente, obteve-se uma energia de activação de  $16 \pm 2$  kcal/mol para a levedura na forma imobilizada e de  $31 \pm 8$  kcal/mol na forma livre, constatando-se que o valor da energia de activação para o caso da levedura estar na forma livre é semelhante ao valor referido na literatura.

Na tentativa de estudar alguns parâmetros tais como concentração de ácido L-málico, carga de ProMalic<sup>®</sup>, caudal de recirculação e a presença de *Saccharomyces cerevisiae* e de modo a facilitar o processo de desacidificação de grandes volumes de mosto/ vinho em adegas, efectuou-se uma montagem experimental na qual foi usado um fermentador de leito fixo com reciclo total tendo-se observado que:

- (i) A velocidade de degradação do ácido L-málico aumenta com a sua concentração.
- (ii) Com o aumento da carga de ProMalic<sup>®</sup>, aumenta a velocidade de degradação do ácido L-málico.
- (iii) O aumento de caudal de recirculação não afectou a velocidade de degradação do ácido L-málico.
- (iv) A levedura *Saccharomyces cerevisiae* inibe a acção da levedura *Schizosaccharomyces pombe*, embora essa inibição não surja nos primeiros dias após a inoculação da *Saccharomyces cerevisiae*.

O objectivo proposto de atingir-se 0,5 g/L de ácido L-málico neste processo pode ser alcançado em condições de extrema esterilidade, evitando assim o aparecimento de turvação ao longo do processo de desacidificação pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

Comparando os resultados obtidos em condições idênticas nos ensaios realizados em *batch* com os do fermentador de leito fixo com reciclo total, observou-se um aumento da velocidade de degradação do ácido L-málico com o uso do fermentador uma vez que há outras condições hidrodinâmicas que permitem fazer face a limitações de transporte no filme à superfície das esferas de alginato.

### **Sugestões para Trabalho Futuro:**

Ao longo deste trabalho, foram surgindo questões cujo esclarecimento permaneceu em aberto e que seria interessante complementar no futuro.

Relativamente ao estudo de diferentes caudais de recirculação, seria interessante estudar o efeito de um caudal inferior a 100 mL/min e de outro entre 100 e 257 mL/min no processo de desacidificação. Relativamente ao estudo da influência da carga de ProMalic<sup>®</sup>, os estudos efectuados demonstraram que o aumento da massa de ProMalic<sup>®</sup> não é proporcional ao aumento da velocidade de degradação, embora num ensaio com uma carga superior a 10 g/L de ProMalic<sup>®</sup> seja possível atingir a velocidade máxima de degradação de ácido L-málico. No futuro, poder-se-ia determinar qual a carga máxima de ProMalic<sup>®</sup> para a qual se atingiria uma velocidade de degradação constante.

A realização de um estudo com vinho no fermentador de leito fixo com reciclo total seria interessante para verificar a influência da concentração de etanol no processo de desacidificação, avaliar a possível ocorrência de turvação pela *Saccharomyces cerevisiae* e posteriormente, comparar com os resultados obtidos em descontínuo. Também poderia ser efectuada uma avaliação da possibilidade de reutilização do catalisador sobre a cinética de fermentação e a integridade física do suporte de imobilização.

Finalmente, um trabalho na área de optimização do fermentador de leito fixo seria fundamental para optimizar as condições operatórias do fermentador no sentido de se obter uma maior conversão de ácido L-málico num tempo de operação mínimo.

---

**Capítulo V**

**Bibliografia**

**Alcântara, F.;** Cunha, M.A.; Almeida, M.A. *Microbiologia: Práticas Laboratoriais*; 2ª Edição, Universidade de Aveiro: Aveiro, 2001.

**Aquarone, E.;** Lima, U.A.; Borzani, W. *Alimentos e Bebidas Produzidos por Fermentação*; Editora Edgard Blücher Ltda: São Paulo, Volume 5, 1983.

**Belitz, H.D.;** Grosch, W. *Food Chemistry*; Springer-Verlag: Berlim, 1987.

**Blouin, J.** Pratique raisonnee du SO<sub>2</sub> en oenologie [em linha]. [publicado em 18 de Julho de 2007]. [citado em 16 de Maio de 2008]. Disponível em URL: <http://sn1.cher-alice.fr/vin/article/index.htm>

**Boulton, R.B.;** Singleton, V.L.; Bisson, L.F.; Kunkee, R.E. *Principles and practices of winemaking*; Chapman & Hall: Nova Iorque, 1996.

**Cabral, J.M.S.;** Barros, M.R.A.; Gama, M. *Engenharia enzimática*, Lidel: Lisboa, 2003.

**Camarasa, C.;** Bidard, F.; Bony, M.; Barre, P.; Dequin, S.; Characterization of *Schizosaccharomyces pombe* malate permease by expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology* 9 , 4144-4151, (2001).

**Campos, L.S.** *Entender a Bioquímica: O metabolismo fundamental em animais e plantas*; 2ª Edição, Escolar Editora: Lisboa, 1999.

**Carone, A.** SO<sub>2</sub> [em linha]. [publicado em 2005] [citado em 16 de Dezembro de 2007]. Disponível em URL: <http://www.avaq.com/SO2.ppt>

**Carvalheira, J.** Filtração dos vinhos [em linha] [citado em 24 de Maio de 2008]. Disponível em URL:

[http://www.drapc.min-agricultura.pt/base/geral/files/filtracao\\_vinhos.pdf](http://www.drapc.min-agricultura.pt/base/geral/files/filtracao_vinhos.pdf)

**Casablancas, F.G.;** Santin, J.L. *Ingeniería Bioquímica*; Editorial Sintesis: Madrid, 1998.

**Caves Aliança.** Roteiro dos vinhos [em linha] [publicado em 26 de Setembro de 2003]. [citado em 5 Abril de 2008]. Disponível em URL: [http://www.aondevamoscomer.com/2004/Roteiro\\_dos\\_vinhos\\_outras\\_noticias.asp?ID=16](http://www.aondevamoscomer.com/2004/Roteiro_dos_vinhos_outras_noticias.asp?ID=16)

**Cerdán**, T.G., Azpilicueta, C.A.; Effect of SO<sub>2</sub> on the formation and evolution of volatile compounds in wines. *Food Control* 18, 1501-1506, (2007a).

**Cerdán**, T.G., Fontanet, A.R.M., Gil, M.A., Belloso, O.M., Azpilicueta, C.A.; Influence of SO<sub>2</sub> on the consumption of nitrogen compounds through alcoholic fermentation of must sterilized by pulsed electric fields. *Food Chemistry* 103, 771-777, (2007b).

**Collado**, Q. Levaduras y la fermentación alcohólica [em linha] [publicado em 27 de Novembro de 2001] [citado em 23 Maio de 2008]. Disponível em URL: <http://www.verema.com/opinamos/tribuna/articulos/levaduras02.asp>

**Delanoe**, D.; Maillard, C.; Maisondieu, D. *O Vinho da análise à elaboração*; 2ª Edição, Publicações Europa- América: Mem Martins, 1997.

**Delpech**, C.; Une nouvelle voie de désacidification des moûts. *Viti Technique* 273, 46-48, (2002).

**Ferreira**, C. Machado, B.; Tavares, C. Especialização em Produção enológica [em linha]. Porto: Escola de Tecnologia e Gestão Industrial [citado em 20 Janeiro de 2008]. Disponível em URL: <http://www.aesbuc.pt/twt/ETGI/MyFiles/MeusSites/Enologia/tinto/index.htm>

**Figueiredo**, J. L.; Ribeiro, F. L. *Catálise Heterogénea*; Fundação Calouste Gulbenkian: Lisboa, 1987.

**Fogler**, H. S. *Elements of Chemical reaction Engineering*; 2ª edição, Prentice Hall: USA, 1992.

**Fonseca**, M. M. ; Teixeira, J. A. Reactores Biológicos : Fundamentos e Aplicações; Lidel, 2001.

**García**, A.P., Martínez, C. S., Manso, J. M. H.; Manejo de la acidez del vino base cava desde el punto de vista organoléptico. *Revista de enología* [em linha]. Fevereiro de 2006 [citado em 28 de Março de 2008]. Disponível em URL: [http://www.acenologia.com/ciencia74\\_3.htm](http://www.acenologia.com/ciencia74_3.htm)



**Garcia, A.S.C;** Práticas enológicas internacionalmente reconhecidas. *Ciência Téc. Vitiv.* 2, 105-130, (2005).

**Gayon, P. R. ;** Dubordieu, D. ; Donèche, B. ; Lonvaud, A. *Traité D'oenologie 1. Microbiologie du vin Vinifications*; Dunod: Paris, 1998.

**Gayon, P. R. ;** Glories, Y. ; Maujean, A. Dubordieu, D. *Traité D'oenologie 2. Chimie du vin stabilisation et traitements*; Dunod: Paris, 1998.

**Gonçalves, M.** Glossário [em linha]. Matosinhos: Lusowine, 2008 [citado em 9 de Maio de 2008 - 14:52]. Disponível em URL:

[http://www.lusowine.com/PN\\_Glossary+main.html](http://www.lusowine.com/PN_Glossary+main.html)

**Hidalgo, J. M. A,** Arribas, M. V. M., Alvarez, P. J. M. e Polo, M. C. ; Influence of malolactic fermentation, postfermentative treatments and ageing with lees on nitrogen compounds of red wines. *Food Chemistry* 103, 572-581, (2007).

**Husnik, J. I.,** VolschenK, H., Bauer, J., Colavizza, D., Luo, Z. e Vuuren, H. J. J. ; Metabolic engineering of malolactic wine yeast. *Metabolic Engineering* 8, 315-323, (2006).

**Infovini.** Conhecer: Como se faz o vinho [em linha]. Leça do Balio: Infovini, (2008) [citado em 21 de Janeiro de 2008]. Disponível em URL: <http://www.infovini.com/pagina.php?codPagina=23>

**Lepe, J.A.S.;** Leal, B.I. *Microbiologia Enologica: Fundamentos de vinificacion*; 2ª Edição: Ediciones Mundi Prensa: Bilbao, 1992.

**Lepe, J.A.S.** *Levaduras vnicas: Funcionalidad Y Uso en Bodega*; Ediciones Mundi-Prensa: Bilbao, 1997.

**Maconi, E.,** Manachini, P. L., Aragozzini, F., Gennari, C. e Ricca, G. S.; A study of the maloalcoholic fermentation pathway in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochem. J.* 217, 585-588, (1984).

**Oom, M.M.S.O.S.C.;** Estudo da Bioconservação de energia durante a fermentação Maloláctica em *Leuconostoc oenos*, Universidade Nova de Lisboa- Lisboa, 1996 (tese de doutoramento).

**Osothsilp, C., Subden, R. E.;** Malate Transport in *Schizosaccharomyces pombe*. J. Bacteriol. 168, 1439-1443, (1986).

**Peynaud, E.** *Conhecer e trabalhar o vinho*; Litexa Editora: Lisboa- Porto, 1993.

**Proenol.** ProMalic<sup>®</sup> [em linha] (revisto em 11 Junho de 2004) [citado em 21 de Maio de 2007]. Disponível em URL: <http://www.vinquiry.com/pdf/promalic%20jun%2004.pdf>

**Regulamentação vitivinícola.** Bases do fomento da vitivinicultura [em linha]. Lisboa: Ministério da Economia (revisto em Setembro de 1974) [citado em 30 de Novembro de 2007]. Disponível em URL: [http://www.ivv.min-agricultura.pt/regulamentacao/filtro/mytexto.jsp?Consulta=.em+TEMA+\(Prepara%E7%E3o\)&Pos=0](http://www.ivv.min-agricultura.pt/regulamentacao/filtro/mytexto.jsp?Consulta=.em+TEMA+(Prepara%E7%E3o)&Pos=0)

**Schuller, D.; Casal, M.** A utilização de estirpes de leveduraa geneticamente modificadas em enologia. Infowine- revista internet de viticultura e enologia [em linha]. Braga: Universidade do Minho, 5 de Maio de 2006 [citado em 22 Abril de 2008]. Disponível em URL: <http://repositorium.sdum.uminho.pt/dspace/handle/1822/5084>

**Silva, S., Portugal, F.R., Silva, P., Abreu, S., Teixeira, M.F., Strehaiano, P.;** Démalication de moûts blancs et rouges par les levures *Schizosaccharomyces pombe* incluses dans des billes d'alginate sèches. *Revue Française d'oenologie* 196, 18-21, (2002).

**Silva, S., Portugal, F.R., Andrade, P., Abreu, S., Teixeira, M.F., Strehaiano, P.;** Malic Acid Consumption by Dry Immobilized Cells of *Schizosaccharomyces pombe*. *Am. J. Enol. Vitic.* 54, 50-55, (2003).

**Soares, M.F.M.; Ferreira, V.W.** *Grande Dicionário Enciclopédico Ediclube*; Ediclube: Alfragide, volume XVIII, 1996.

**Soleas, G.J.**; Diamandis, E.P.; Goldberg, D.M.; Wine as a Biological Fluid: History, Production and Role in Disease Prevention. *Journal of Clinic Laboratory Analysis* 11, 287-313, (1997).

**Sousa, M. J.**, Mota, M., Leão, C.; Effects of ethanol and acetic acid on the transport of malic acid and glucose in the yeast *Schizosaccharomyces pombe*: implications in wine deacidification. *FEMS Microbiology Letters* 126, 197-202, (1995).

**Strehaiano, P.**, Portugal, F.R., Taillandier, P., Silva, S., Nepveu, F. ; Levures et maîtrise de l'acidité des moûts et des vins. *Revue des oenologues* 105, 23-27.

**Strehaiano, P.** e Taillandier, P. ; Nouvelles utilisations des levures *Schizosaccharomyces* encapsulées pour la désacidification des mouts de raisin. *Journée Technique Régionale*, Institut Technique du Vin, Toulouse, 2001

**Taillandier, P.** ; Désacidification des moûts par *Schizosaccharomyces*: Analyse cinétique et métabolique, Institut National Polytechnique de Toulouse, France, 1990 (tese de doutoramento).

**Taillandier, P.**, Gillis, M., Strehaiano, P.; Deacidification by *Schizosaccharomyces* : interactions with *Saccharomyces*. *Journal of Biotechnology* 40, 199-205, (1995).



**Anexo A - Propriedades do fermentador, do ProMalic® e da solução de mosto****Tabela A.1** – Diâmetro interno do fermentador.

	$D_{\text{int}}$ (cm)
reactor	3,62

**Tabela A.2** – Diâmetro e densidade das esferas de ProMalic® re-hidratadas.

	$D_{\text{esf}}$ (cm)	$\rho_{\text{esf}}$ (g/cm <sup>3</sup> )
ProMalic®	0,21	1,64

**Tabela A.3** – Massa específica e da densidade da solução de mosto.

	$\rho$ (g/cm <sup>3</sup> )	$\eta$ (cP)
Solução de mosto	1,08	7

**Anexo B – Teste de reprodutibilidade dos métodos de Ripper simples e duplo.****Tabela B.1-** Concentração de anidrido sulfuroso na forma livre e total para o método de Ripper simples e método de Ripper duplo com respectiva média, desvio padrão e intervalo de confiança.

ensaio	Método de Ripper simples		Método de Ripper duplo	
	$[\text{SO}_2]_{\text{livre}}$ (mg/L)	$[\text{SO}_2]_{\text{total}}$ (mg/L)	$[\text{SO}_2]_{\text{livre}}$ (mg/L)	$[\text{SO}_2]_{\text{total}}$ (mg/L)
1	25,60	79,36	22,40	99,20
2	25,60	79,36	22,40	99,20
3	25,60	81,92	22,40	99,20
4	22,40	79,36	22,40	102,40
5	25,60	79,36	19,20	96,00
6	28,80	81,92	28,80	99,20
7	19,20	79,36	19,20	96
Média	24,69	80,09	22,40	98,74
Desvio padrão	3,04	1,25	3,20	2,21
IC superior	27,20	81,12	35,05	100,57
IC inferior	22,17	79,06	19,75	96,92

O intervalo de confiança foi determinado para ambos os métodos através da seguinte equação:

$$IC = \bar{x} \pm \frac{ts}{\sqrt{N}} \quad (\text{B.1})$$

onde  $t$  é valor tabelado, tendo em conta o número de graus de liberdade e  $s$  é o desvio padrão.

**Anexo C** - Ensaio para avaliar a influência do anidrido sulfuroso no processo de desacidificação realizado em *batch*.

**Tabela C.1** - Volume adicionado de solução de anidrido sulfuroso a 6% no início do ensaio a diferentes concentrações de anidrido sulfuroso.

SO <sub>2,previsto</sub> (mg/L)	1º adição (μL)	2º adição (μL)	3º adição (μL)	4º adição (μL)	5º adição (μL)	6º adição (μL)	V <sub>total</sub> (μL)
15	250	65	----	---	---	---	315
30	600	---	---	---	---	---	600
40	700	250	100	250	65	150	1515

**Tabela C.2** - Concentração de anidrido sulfuroso na forma livre presente no mosto após várias adições da solução de anidrido sulfuroso.

SO <sub>2, previsto</sub> (mg/L)	[SO <sub>2</sub> ] <sub>livre</sub> (mg/L)
15	14,40
30	35,20
40	40,00

**Tabela C.3** - Concentração de ácido L-málico ao longo do processo de desacidificação a 15°C para as diferentes concentrações iniciais de anidrido sulfuroso livre.

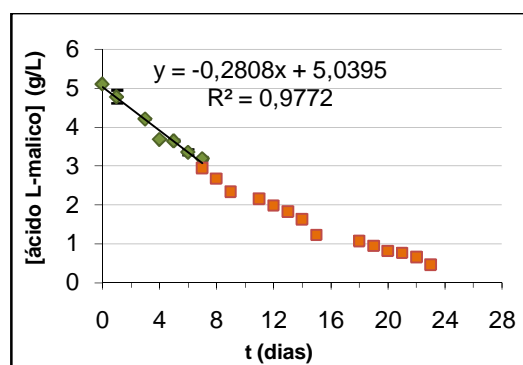
t (dias)	[ácido L-málico] (g/L)				
	0 mg/L SO <sub>2</sub> (testemunha)	0 mg/L SO <sub>2</sub>	15 mg/L SO <sub>2</sub>	30 mg/L SO <sub>2</sub>	40 mg/L SO <sub>2</sub>
1	5,11	5,11	5,11	5,11	5,11
2	5,01	4,78	4,96	4,93	4,70
3	5,14	4,21	4,17	4,22	3,95
4	4,92	3,69	3,67	3,69	3,56
5	5,07	3,65	3,63	3,65	3,48

6	5,16	3,36	3,32	3,34	3,16
7	5,11	3,19	3,13	3,18	2,96
8	5,21	2,96	2,99	3,02	2,75
9	5,06	2,69	2,76	2,77	2,49
11	5,11	2,35	2,37	2,45	2,13
12	5,08	2,16	2,18	2,20	1,92
13	5,06	1,99	1,97	2,00	1,71
14	5,15	1,83	1,80	1,80	1,54
15	5,13	1,64	1,65	1,68	1,42
18	5,21	1,23	1,25	1,26	0,98
19	5,11	1,07	1,07	1,10	0,84
20	4,97	0,95	0,93	0,99	0,76
21	5,03	0,82	0,84	0,86	0,65
22	5,13	0,77	0,78	0,79	----
23	----	0,66	0,68	0,66	----
25	----	----	0,29	0,16	----
26	4,99	0,46	0,41	0,36	----
27	5,00	0,38	0,47	0,46	----

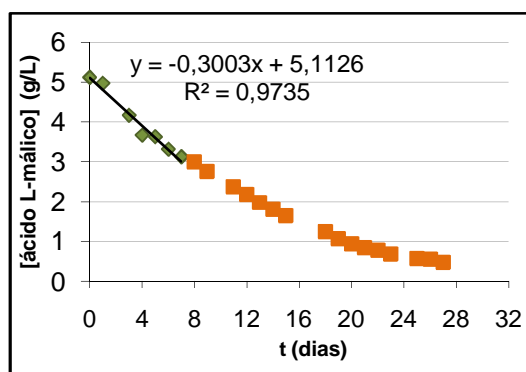
**Tabela C.4** - Concentração de açúcares ao longo do processo de desacidificação a 15°C para as diferentes concentrações iniciais de anidrido sulfuroso livre.

t (dias)	[açúcares] (g/L)				
	0 mg/L SO <sub>2</sub> (testemunha)	0 mg/L SO <sub>2</sub>	15 mg/L SO <sub>2</sub>	30 mg/L SO <sub>2</sub>	40 mg/L SO <sub>2</sub>
0	218,0	169,0	169,0	169,0	169,0
1	312,5	296,5	250,0	188,5	268,8
3	248,5	227,5	228,8	229,3	177,3
4	242,0	233,5	218,8	235,8	230,0
5	214,0	225,0	233,5	218,5	219,0

6	244,5	225,8	236,8	237,3	211,3
7	237,5	230,5	197,0	217,8	225,8
8	195,5	194,0	213,3	215,3	199,3
9	230,5	218,0	196,8	210,8	199,5
11	241,0	214,8	208,3	221,8	171,3
12	220,5	181,8	217,3	204,0	202,0
13	----	----	----	247,0	184,5
14	220,0	175,0	165,5	183,3	196,3
15	----	195,5	219,3	197,5	210,5
18	210,5	188,0	194,5	188,5	180,5
26	226,0	201,0	182,5	176,5	
27	206,0	167,0	174,5	176,5	

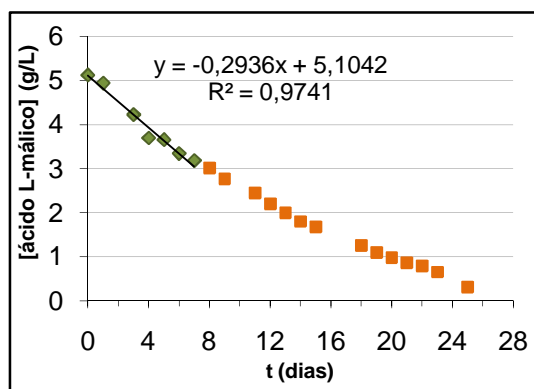


**Figura C.1** – Perfil de concentração de ácido L-málico ao longo do tempo para o ensaio com uma concentração inicial de 0 mg/L de anidrido sulfuroso a 15°C.

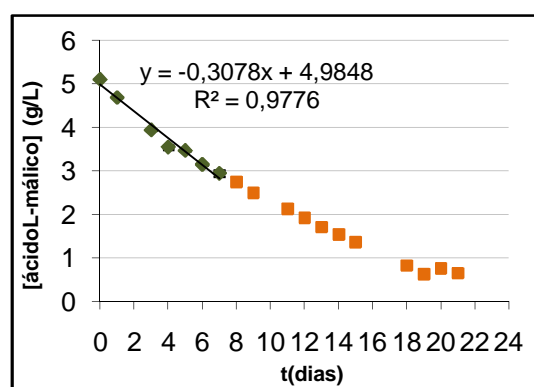


**Figura C.2** – Perfil de concentração de ácido L-málico ao longo do tempo para o ensaio com uma concentração inicial de 15 mg/L de anidrido sulfuroso a 15°C.





**Figura C.3** – Perfil de concentração de ácido L-málico ao longo do tempo para o ensaio com uma concentração inicial de 30 mg/L de anidrido sulfuroso a 15°C.



**Figura C.4** – Perfil de concentração de ácido L-málico ao longo do tempo para o ensaio com uma concentração inicial de 40 mg/L de anidrido sulfuroso a 15°C.

**Anexo D** - Ensaio para avaliar a influência da concentração inicial do ácido L-málico no processo de desacidificação realizado em *batch*.

**Tabela D.1** – Concentração de anidrido sulfuroso no início do ensaio a diferentes concentrações iniciais de ácido L-málico a 15°C.

[ácido L-málico], previsto (g/L)	[ácido málico] (g/L)	SO <sub>2, livre</sub> (mg/L)	SO <sub>2, total</sub> (mg/L)
2	2,16	36,80	76,80
5	5,24	36,80	76,80
8	8,67	36,80	76,80

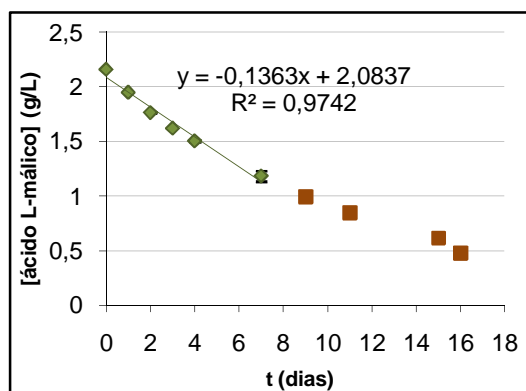
**Tabela D.2** - Concentração de ácido L-málico ao longo do processo de desacidificação a 15°C para diferentes concentrações iniciais de ácido L-málico.

t (dias)	[ácido L-málico] (g/L)			
	5 g/L ácido L-málico (testemunha)	2g/L ácido L-málico	5g/L ácido L-málico	8g/L ácido L-málico
0	5,24	2,16	4,86	8,67
1	4,96	1,95	4,53	8,21
2	5,02	1,77	4,16	7,86
3	4,92	1,62	3,92	7,35
4	4,96	1,51	3,31	6,89
7	5,12	1,19	2,78	5,96
9	4,96	1,00	2,49	5,14
11	5,16	0,85	1,94	4,67
15	4,88	0,62	1,72	3,78
16	4,86	0,48	1,72	3,74
17	4,89	----	1,51	3,44
18	4,90	----	1,42	3,22
19	4,93	----	1,20	3,11
21	4,96	----	0,99	2,76
23	4,90	----	0,91	2,42
24	5,13	----	0,89	2,40
28	4,99	----	0,75	1,52
30	4,93	----	0,71	1,18
31	4,94	----	----	1,97
45	5,11	----	----	1,04
49	5,30	----	----	0,91
50	5,11	----	----	0,87
51	4,90	----	----	0,76
53	5,02	----	----	0,71

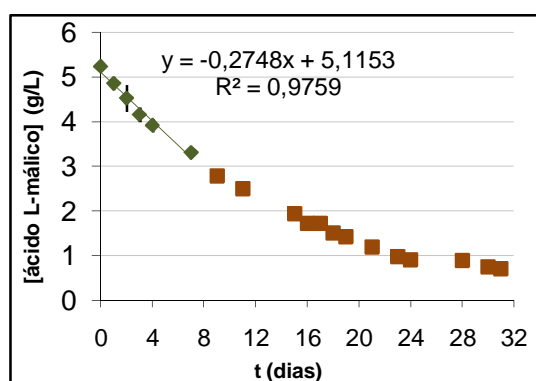
56	5,04	----	----	0,60
57	4,82	----	----	0,52

**Tabela D.3** - Concentração de açúcares ao longo do processo de desacidificação a 15°C para diferentes concentrações iniciais de ácido L-málico.

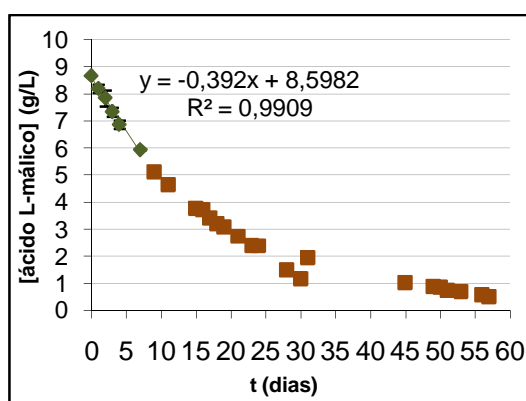
t (dias)	[açúcares] (g/L)			
	5 g/L ácido L-málico (testemunha)	2g/L ácido L-málico	5g/L ácido L-málico	8g/L ácido L-málico
0	250,0	250,0	250,0	250,0
1	242,5	216,3	222,3	219,3
11	244,0	201,8	219,8	211,3
15	----	----	----	197,5
16	----	211,5	----	----
17	----	----	204,8	----
18	202,0	----	204,5	----
21	212,0	----	199,0	201,0
24	210,5	----	193,3	175,0
30	----	----	----	172,0
31	207,0	----	174,50	185,0
45	190,0	----	----	187,5
50	215,5	----	----	184,5
53	184,5	----	----	163,5
56	201,5	----	----	174,5
57	232,0	----	----	187,0



**Figura D.1** – Perfil de concentração de ácido L-málico ao longo do tempo para o ensaio com uma concentração inicial 2 g/L de ácido L-málico a 15°C.



**Figura D.2** – Perfil de concentração de ácido L-málico ao longo do tempo para o ensaio com uma concentração inicial 5 g/L de ácido L-málico a 15°C.



**Figura D.3** – Perfil de concentração de ácido L-málico ao longo do tempo para o ensaio com uma concentração inicial 8 g/L de ácido L-málico a 15°C.

**Tabela D.4** - Concentração de anidrido sulfuroso na forma livre e total no final do ensaio com diferentes concentrações iniciais de ácido L-málico a 15°C.

[ácido L-málico], previsto (g/L)	[SO <sub>2</sub> ] <sub>livre</sub> (mg/L)	[SO <sub>2</sub> ] <sub>total</sub> (mg/L)
Testemunha (5)	3,20	51,20
2	2,40	60,80
5	0,00	58,88
8	3,20	60,16

**Anexo E** - Ensaio para avaliar a influência do etanol no processo de desacidificação realizado em *batch*.

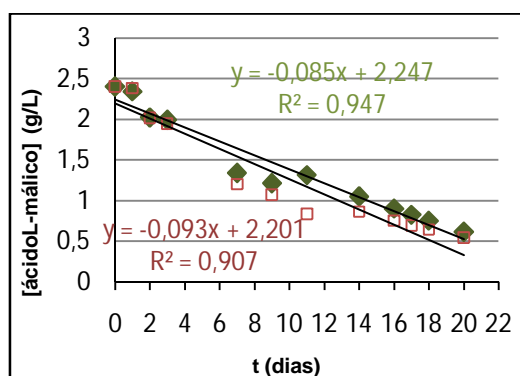
**Tabela E.1** - Concentração de anidrido sulfuroso no início do ensaio realizado para avaliar o efeito do etanol no processo de desacidificação.

[ácido L-málico], previsto (g/L)	[ácido málico] (g/L)	Método de Ripper simples		Método de Ripper duplo	
		[SO <sub>2</sub> ] <sub>livre</sub> (mg/L)	[SO <sub>2</sub> ] <sub>total</sub> (mg/L)	[SO <sub>2</sub> ] <sub>livre</sub> (mg/L)	[SO <sub>2</sub> ] <sub>total</sub> (mg/L)
2	2,41				
5	5,18	25,60	176,64	28,80	185,60
8	7,82				

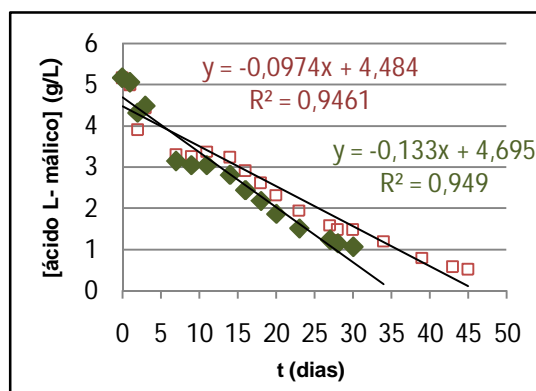
**Tabela E.2** - Concentração de ácido L-málico ao longo do processo de desacidificação a 15°C e 20°C para estudar o efeito do etanol.

t (dias)	[ácido L-málico] (g/L)				
	2g/L ácido L-málico a 15°C	5g/L ácido L-málico a 15°C	8g/L ácido L-málico a 15°C	2g/L ácido L-málico a 20°C	5g/L ácido L-málico a 20°C
0	2,41	5,18	7,82	2,41	5,18
1	2,35	5,01	7,92	2,39	5,07
2	2,03	3,915	7,06	2,02	4,33
3	2,00	4,44	7,4	1,95	4,5
7	1,35	3,31	5,73	1,21	3,15
9	1,22	3,27	5,67	1,08	3,05
11	1,32	3,38	6,15	0,84	3,05
14	1,06	3,24	5,94	0,87	2,81

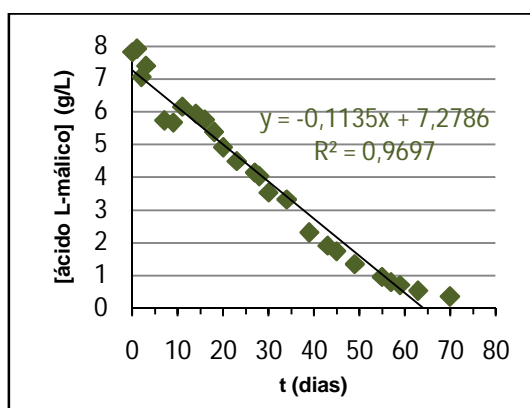
16	0,91	2,915	5,75	0,76	2,44
17	0,83	----	----	0,70	----
18	0,76	2,62	5,38	0,65	2,18
20	0,62	2,315	4,91	0,55	1,86
23	----	1,945	4,49	----	1,51
27	----	1,585	4,14	----	1,23
28	----	1,485	4,03	----	1,14
30	----	1,48	3,53	----	1,06
34	----	1,195	3,32	----	----
39	----	0,79	2,31	----	----
43	----	0,58	1,91	----	----
45	----	0,52	1,74	----	----
49	----	----	1,35	----	----
55	----	----	0,955	----	----
57	----	----	0,795	----	----
58	----	----	0,77	----	----
59	----	----	0,705	----	----
63	----	----	0,535	----	----
70	----	----	0,36	----	----



**Figura E.1** – Perfil de concentração de ácido L-málico ao longo do tempo para o ensaio realizado com uma concentração inicial de 2 g/L a 15 e 20°C e respectiva linearização (2 g/L a 15°C (◆) e 2 g/L a 20°C (◻)).



**Figura E.2** – Perfil de concentração de ácido L-málico ao longo do tempo para o ensaio realizado com uma concentração inicial de 5 g/L a 15 e 20°C e respectiva linearização (( 5 g/L a 15°C (□) e 5g/L a 20°C (◆)).



**Figura E.3** – Perfil de concentração de ácido L-málico ao longo do tempo para o ensaio realizado com uma concentração inicial de 8 g/L a 15°C e respectiva linearização.

**Tabela E.3** - Concentração de anidrido sulfuroso na forma livre e total no final do ensaio realizado para avaliar o efeito do etanol com diferentes concentrações iniciais de ácido L-málico e temperatura.

[ácido L-málico], previsto (g/L)	T (°C)	Método de Ripper simples		Método de Ripper duplo	
		[SO <sub>2</sub> ] <sub>livre</sub> (mg/L)	[SO <sub>2</sub> ] <sub>total</sub> (mg/L)	[SO <sub>2</sub> ] <sub>livre</sub> (mg/L)	[SO <sub>2</sub> ] <sub>total</sub> (mg/L)
2	15	4,80	103,68	8,00	168,00
5	15	1,60	97,28	4,80	182,40
8	15	1,60	92,80	8,00	172,80
2	20	0,00	94,72	6,40	164,80
5	20	0,00	97,92	4,80	134,40

**Anexo F** - Ensaio para avaliar a influência da temperatura no processo de desacidificação realizado em *batch*.

**Tabela F.1** – Concentração inicial de anidrido sulfuroso presente em cada um dos ensaios a diferentes temperaturas utilizando o ProMalic®.

T (°C)	[SO <sub>2</sub> ] <sub>livre</sub> (mg/L)	[SO <sub>2</sub> ] <sub>total</sub> (mg/L)
10	16,00	87,04
15	16,00	87,04
18	12,80	89,60
20	9,60	81,20
22	12,80	87,04

**Tabela F.2** - Concentração de ácido L-málico ao longo do processo de desacidificação utilizando a levedura *Schizosaccharomyces pombe* imobilizada para estudar o efeito da temperatura.

t (dias)	[ácido L-málico] (g/L)				
	10°C	15°C	18°C	20°C	22°C
0	5,19	5,19	4,60	5,14	4,81
1	5,33	5,13	4,27	4,60	4,36
2	5,16	4,95	3,99	----	3,75
3	----	----	3,67	3,24	----
4	4,78	4,39	2,94	----	----
5	----	----	----	----	2,69
6	----	----	----	2,78	2,14
7	4,56	3,91	2,50	2,29	1,38
8	----	----	----	2,09	1,19
9	----	----	2,06	----	----
10	----	----	----	1,45	----
11	3,59	2,79	1,61	----	----
13	3,11	2,39	----	0,49	----
14	3,03	2,24	1,14	----	----
15	----	----	0,96	----	----
16	----	----	0,81	----	----

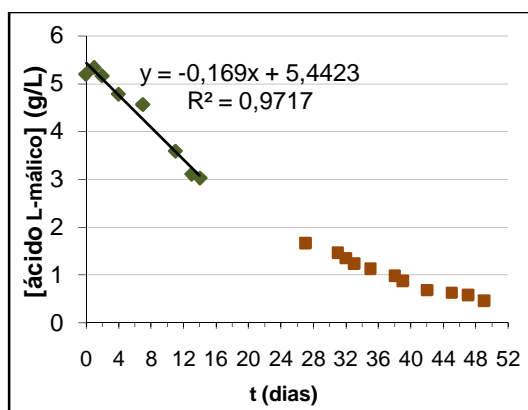


17	----	----	0,71	----	----
18	----	----	0,51	----	----
27	1,67	0,65	----	----	----
31	1,47	----	----	----	----
32	1,36	----	----	----	----
33	1,24	----	----	----	----
35	1,14	----	----	----	----
38	0,99	----	----	----	----
39	0,88	----	----	----	----
42	0,69	----	----	----	----
45	0,63	----	----	----	----
47	0,58	----	----	----	----
49	0,46	----	----	----	----

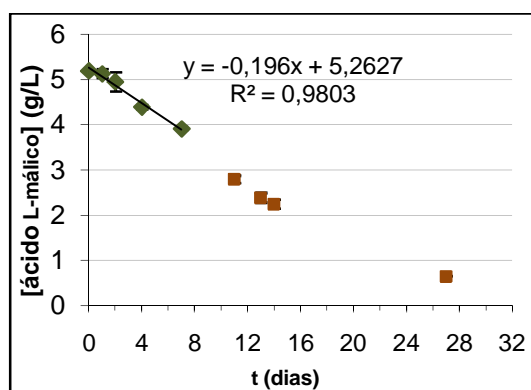
**Tabela F.3** - Concentração de açúcares ao longo do processo de desacidificação utilizando a levedura *Schizosaccharomyces pombe* imobilizada para estudar o efeito da temperatura.

t (dias)	[açúcares] (g/L)				
	10°C	15°C	18°C	20°C	22°C
0	223,0	223,0	195,0	188,0	199,0
1	229,8	232,3	197,5	----	----
2	----	----	189,3	----	288,8
3	----	----	----	188,0	----
4	228,8	230,75	185,5	----	----
5	----	----	----	----	291,8
7	----	----	189,8	177,8	271,3
8	----	----	----	----	172,5
9	----	----	186,3	185,0	----
13	----	----	----	170,0	----
14	204,0	193,5	197,8	----	----

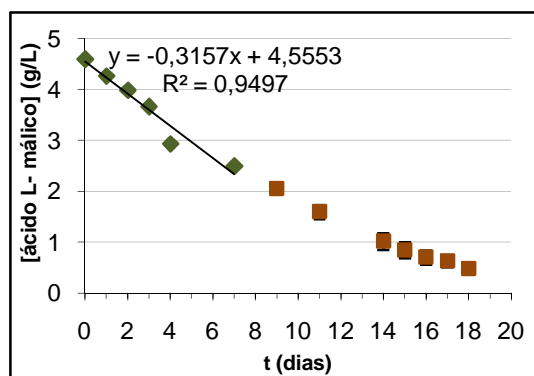
15	----	----	167,5	----	----
17	----	----	176,8	----	----
18	----	----	174,3	----	----
27	199,8	177,0	----	----	----
32	214,0	----	----	----	----
35	179,5	----	----	----	----
38	203,8	----	----	----	----
42	189,3	----	----	----	----
45	197,3	----	----	----	----
47	189,8	----	----	----	----
49	185,8	----	----	----	----



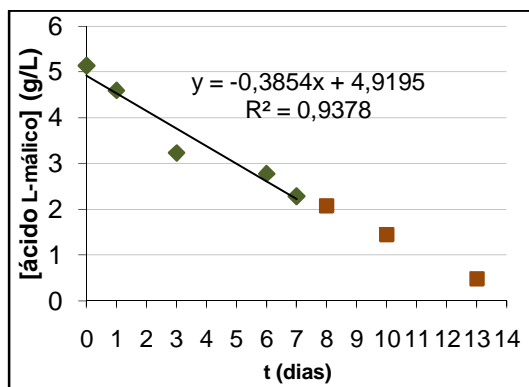
**Figura F.1** – Perfil de concentração de ácido L-málico ao longo do tempo e respectiva linearização a 10°C para o ProMalic®.



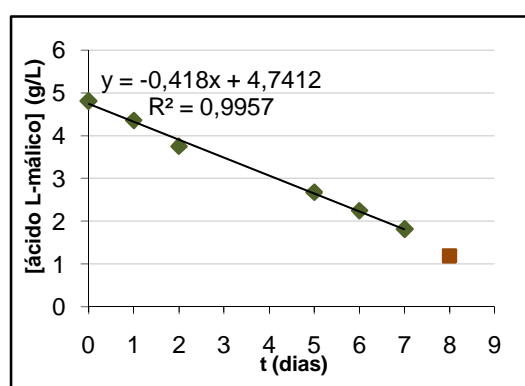
**Figura F.2** – Perfil de concentração de ácido L-málico ao longo do tempo e respectiva linearização a 15°C para o ProMalic®.



**Figura F.3** – Perfil de concentração de ácido L-málico ao longo do tempo e respectiva linearização a 18°C para o ProMalic®.



**Figura F.4** – Perfil de concentração de ácido L-málico ao longo do tempo e respectiva linearização a 20°C para o ProMalic®.



**Figura F.5** – Perfil de concentração de ácido L-málico ao longo do tempo e respectiva linearização a 22°C para o ProMalic®.

**Tabela F.4** – Registo da concentração de anidrido sulfuroso no final do ensaio realizado a diferentes temperaturas utilizando a levedura *Schizosaccharomyces pombe* imobilizada em dupla camada de alginato.

T (°C)	[SO <sub>2</sub> ] <sub>livre</sub> (mg/L)	[SO <sub>2</sub> ] <sub>total</sub> (mg/L)
10	3,20	92,16
15	0,80	57,60
18	3,20	52,48
20	3,20	64,00
22	0,00	58,88

**Tabela F.5** – Concentração inicial de anidrido sulfuroso presente em cada um dos ensaios realizado a diferentes temperaturas utilizando a levedura *Schizosaccharomyces pombe* livre.

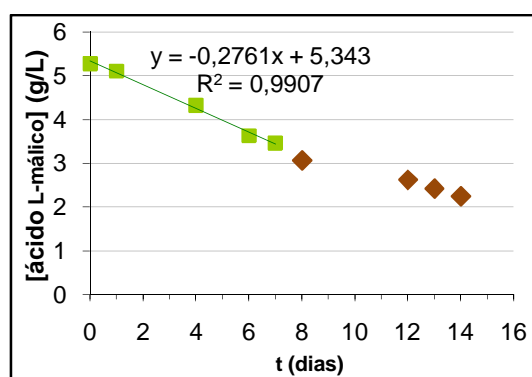
T (°C)	[SO <sub>2</sub> ] <sub>livre</sub> (mg/L)	[SO <sub>2</sub> ] <sub>total</sub> (mg/L)
10		
15	16,00	97,28
20		

**Tabela F.6** - Concentração de ácido L-málico ao longo do processo de desacidificação utilizando a levedura *Schizosaccharomyces pombe* livre para estudar o efeito da temperatura.

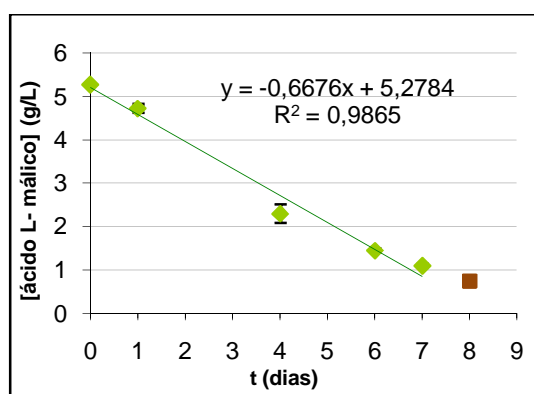
t (dias)	[ácido L-málico] (g/L)		
	10°C	15°C	20°C
0	5,28	5,28	5,28
1	5,11	4,73	4,40
4	4,32	2,31	1,13
6	3,63	1,46	0,51
7	3,46	1,11	----
8	3,06	0,75	----
12	2,62	----	----
13	2,43	----	----
14	2,25	----	----

**Tabela F.7** - Concentração de açúcares ao longo do processo de desacidificação utilizando a levedura *Schizosaccharomyces pombe* livre para estudar o efeito da temperatura.

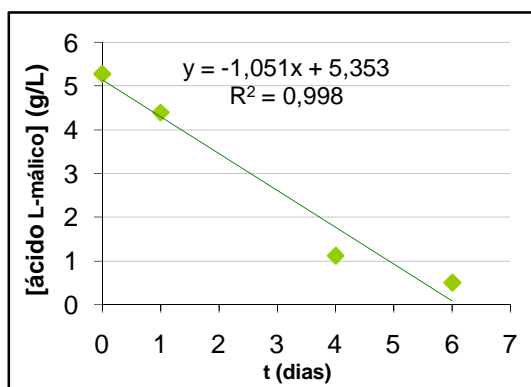
t (dias)	[açúcares] (g/L)		
	10°C	15°C	20°C
0	182	182	182,0
1	192,3	190,3	187,8
6	----	----	174,3
7	207,3	194,3	----
8	----	195,8	----
14	205,5	----	----



**Figura F.6** – Perfil de concentração de ácido L-málico ao longo do tempo e respectiva linearização a 10°C para a levedura *Schizosaccharomyces pombe* na forma livre.



**Figura F.7** – Perfil de concentração de ácido L-málico ao longo do tempo e respectiva linearização a 15°C para a levedura *Schizosaccharomyces pombe* na forma livre.



**Figura F.8** – Perfil de concentração de ácido L-málico ao longo do tempo e respectiva linearização a 20°C para a levedura *Schizosaccharomyces pombe* na forma livre.

**Tabela F.8** – Concentração final de anidrido sulfuroso presente em cada um dos ensaios realizado a diferentes temperaturas com a levedura *Schizosaccharomyces pombe* livre.

T (°C)	[SO <sub>2</sub> ] <sub>livre</sub> (mg/L)	[SO <sub>2</sub> ] <sub>total</sub> (mg/L)
10	0,00	90,88
15	4,80	80,64
20	0,00	78,08

**Anexo G** - Influência da concentração inicial de ácido L-málico no processo de desacidificação num fermentador de leito fixo com reciclo total.

**Tabela G.1** – Concentração de anidrido sulfuroso no início do ensaio realizado num fermentador de leito fixo com reciclo total com diferentes concentrações iniciais de ácido L-málico a 15°C.

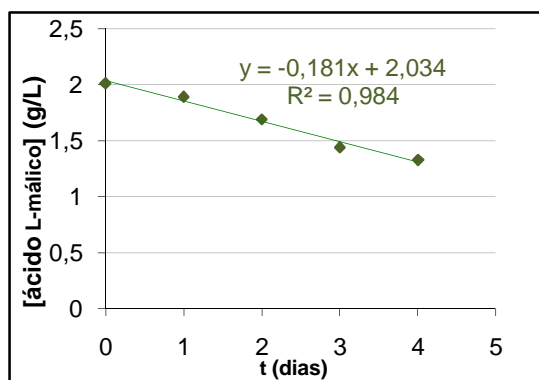
[ácido L-málico] <sub>previsto</sub> (g/L)	Método de Ripper simples		Método de Ripper duplo	
	[SO <sub>2</sub> ] <sub>livre</sub> (mg/L)	[SO <sub>2</sub> ] <sub>livre</sub> (mg/L)	[SO <sub>2</sub> ] <sub>livre</sub> (mg/L)	[SO <sub>2</sub> ] <sub>total</sub> (mg/L)
2	12,80	92,16	16,00	112,00
5	16,00	97,28	19,20	137,60

**Tabela G.2** - Concentração de ácido L-málico ao longo do processo de desacidificação num fermentador de leito fixo com reciclo total a 15°C para estudar o efeito da concentração inicial de ácido L-málico.

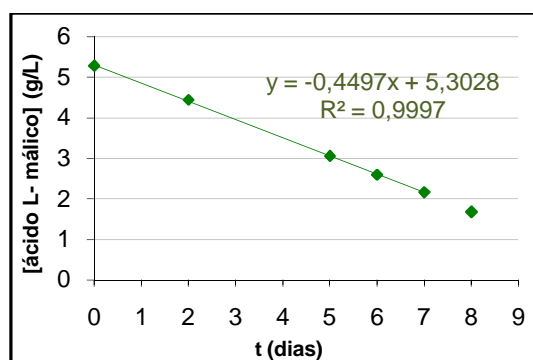
t (dias)	[ácido L-málico] (g/L)	
	2g/L ácido L-málico	5g/L ácido L-málico
0	2,01	5,28
1	1,89	----
2	1,69	4,44
3	1,44	----
4	1,33	----
5	----	3,05
6	----	2,59
7	0,60	2,16
8	----	1,68
9	----	1,21

**Tabela G.3** - Concentração de açúcares ao longo do processo de desacidificação num fermentador de leito fixo com reciclo total a 15°C para estudar o efeito da concentração inicial de ácido L-málico.

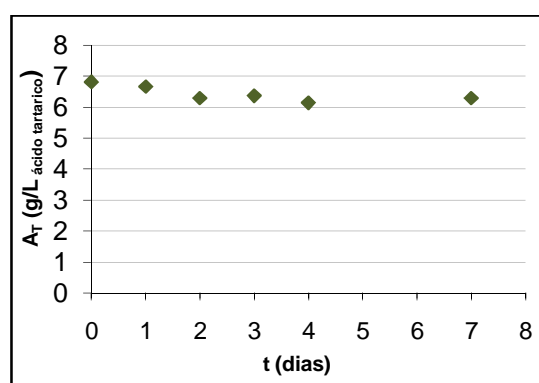
t (dias)	[açúcares] (g/L)	
	2g/L ácido L-málico	5g/L ácido L-málico
0	200,5	217,0
1	202,5	----
3	194,5	----
4	194,0	----
5	----	212,0
7	172,0	----
9	----	171,5



**Figura G.1** – Perfil de concentração de ácido L-málico no fermentador de leito fixo com reciclo total ao longo do tempo e respectiva linearização para o ensaio com uma concentração inicial de ácido L-málico de 2 g/L a 15°C.

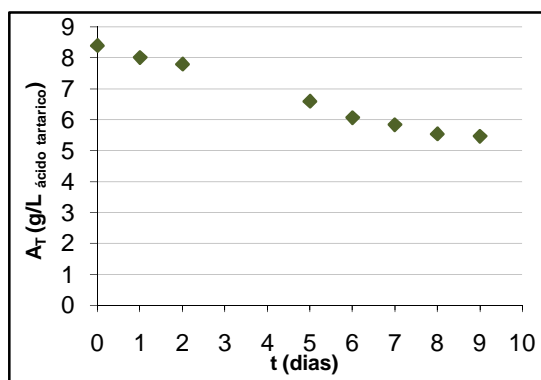


**Figura G.2** – Perfil de concentração de ácido L-málico no fermentador de leito fixo com reciclo total ao longo do tempo e respectiva linearização para o ensaio com uma concentração inicial de ácido L-málico de 5 g/L a 15°C.

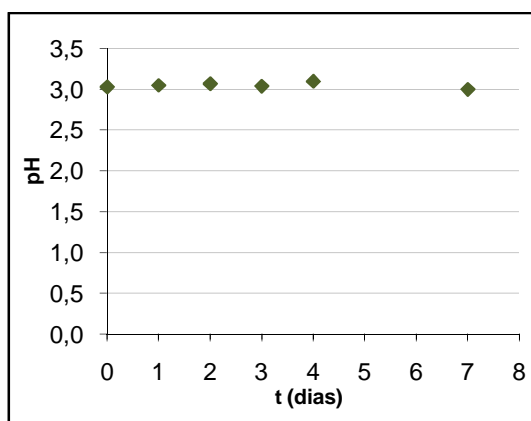


**Figura G.3** – Variação da acidez total no fermentador de leito fixo com reciclo total ao longo do tempo para o ensaio com uma concentração inicial de ácido L-málico de 2 g/L a 15°C.

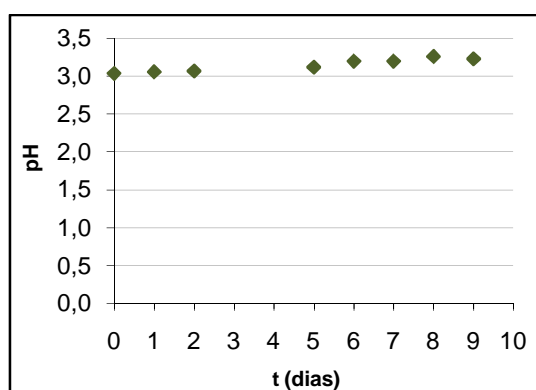




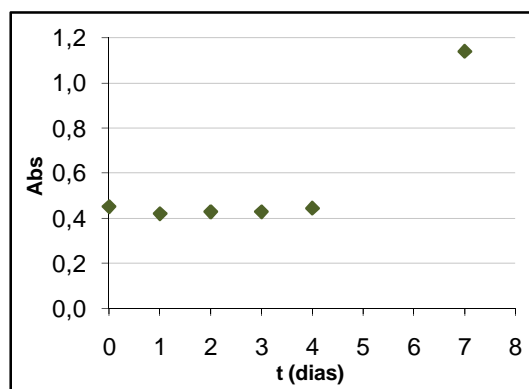
**Figura G.4** – Variação da acidez total no fermentador de leite fixo com reciclo total ao longo do tempo para o ensaio com uma concentração inicial de ácido L-málico de 5 g/L a 15°C.



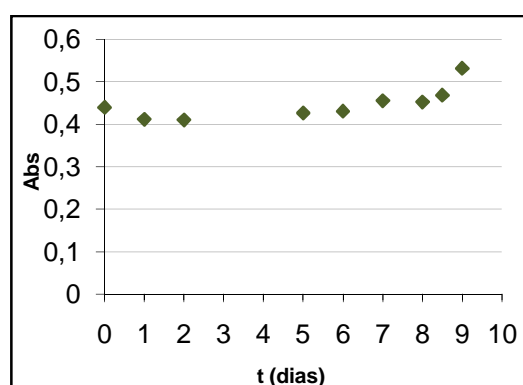
**FiguraG.5** – Variação do pH no fermentador de leite fixo com reciclo total ao longo do tempo para o ensaio com uma concentração inicial de ácido L-málico de 2 g/L a 15°C.



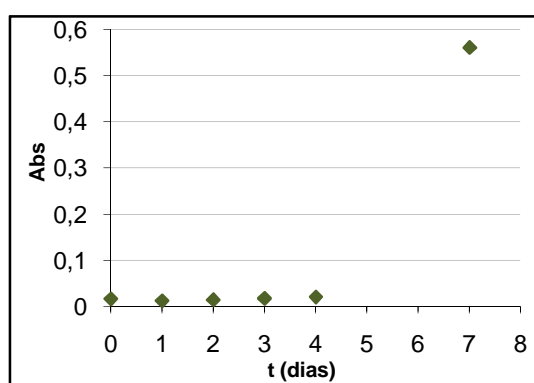
**Figura G.6** – Variação do pH no fermentador de leite fixo com reciclo total ao longo do tempo para o ensaio com uma concentração inicial de ácido L-málico de 5 g/L a 15°C.



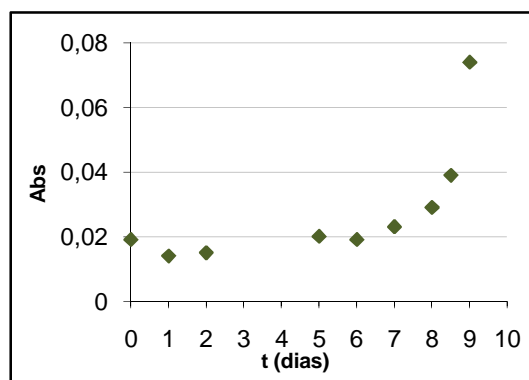
**Figura G.7** – Variação da absorvância a 400 nm no fermentador de leito fixo com reciclo total ao longo do tempo para o ensaio com uma concentração inicial de ácido L-málico de 2 g/L a 15°C.



**Figura G.8** – Variação da absorvância a 400 nm no fermentador de leito fixo com reciclo total ao longo do tempo para o ensaio com uma concentração inicial de ácido L-málico de 5 g/L a 15°C.



**Figura G.9** – Variação da absorvância a 620 nm no fermentador de leito fixo com reciclo ao longo do tempo para o ensaio com uma concentração inicial de ácido L-málico de 2 g/L a 15°C.



**Figura G.10** – Variação da absorvância a 620 nm no reactor ao longo do tempo para o ensaio com uma concentração inicial de ácido L-málico de 5 g/L a 15°C.

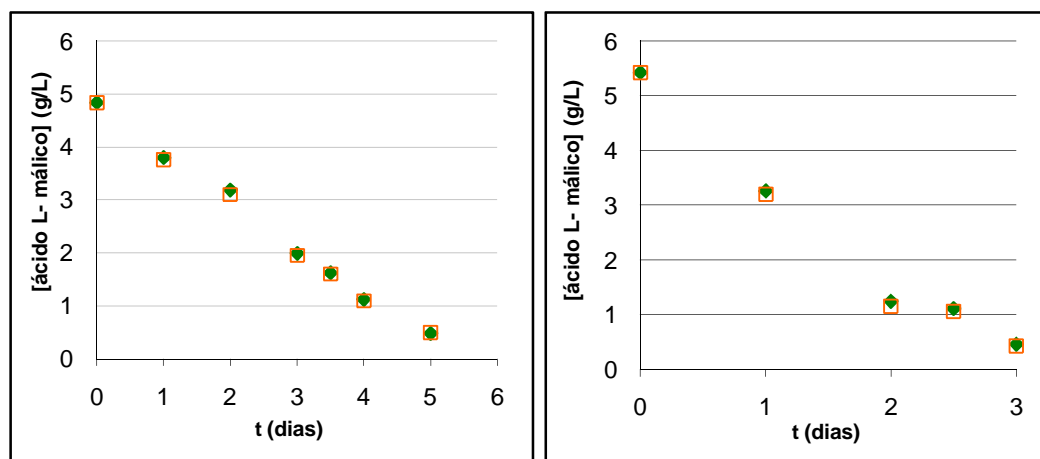
**Tabela G.4** – Concentração de anidrido sulfuroso no final do ensaio realizado com diferentes concentrações de ácido L-málico a 15°C.

[ácido L-málico], <sub>previsto</sub> ( g/L)	Método de Ripper simples		Método de Ripper duplo	
	[SO <sub>2</sub> ] <sub>livre</sub> (mg/L)	[SO <sub>2</sub> ] <sub>livre</sub> (mg/L)	[SO <sub>2</sub> ] <sub>livre</sub> (mg/L)	[SO <sub>2</sub> ] <sub>total</sub> (mg/L)
2	0,00	43,52	12,80	112,00
5	3,20	76,80	6,40	124,80

## Anexo H - Influência da carga de ProMalic® no processo de desacidificação num fermentador de leito fixo com reciclo total.

**Tabela H.1** – Concentração de anidrido sulfuroso no início do ensaio realizado com diferentes cargas de ProMalic® a 15°C.

mProMalic (g/L)	Método de Ripper simples		Método de Ripper duplo	
	[SO <sub>2</sub> ] <sub>livre</sub> (mg/L)	[SO <sub>2</sub> ] <sub>livre</sub> (mg/L)	[SO <sub>2</sub> ] <sub>livre</sub> (mg/L)	[SO <sub>2</sub> ] <sub>total</sub> (mg/L)
2	16,00	84,48	22,40	150,40
5	6,40	72,96	16,00	121,60
10	16,00	89,60	19,20	134,40



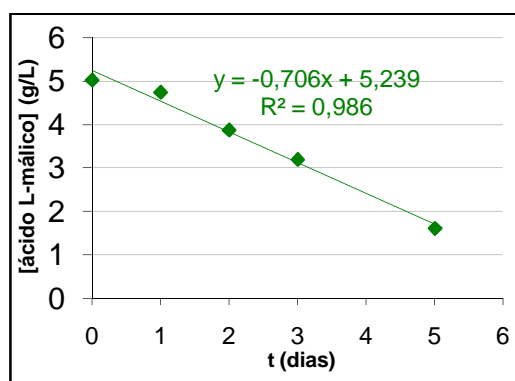
**Figura H.1** – Evolução do consumo do ácido L-málico no fermentador a 15°C com concentração inicial de 5 g/L de ácido L-málico e carga de ProMalic® 5 g/L (a) 10 g/L (b) (entrada do reactor (◆) e saída do reactor (□)).

**Tabela H.2** - Concentração de ácido L-málico ao longo do processo de desacidificação num fermentador de leito fixo com reciclo total a 15°C para estudar o efeito da carga de ProMalic®.

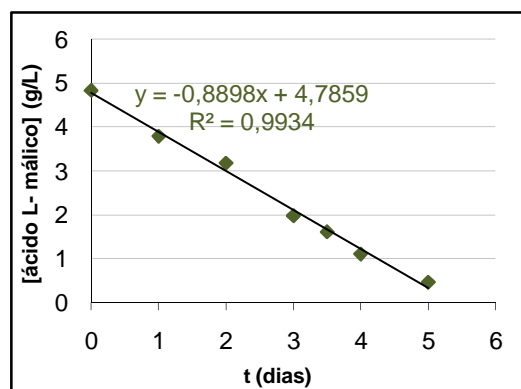
t (dias)	[ácido L-málico] (g/L)			
	1 g/L ProMalic	2 g/L ProMalic	5 g/L ProMalic	10 g/L ProMalic
0	5,28	5,02	4,84	5,42
1	----	4,74	3,80	3,26
2	4,44	3,87	3,19	1,24
2,5	----	----	----	1,11
3	----	3,19	1,99	0,46
3,5	----	----	1,62	----
4	----	----	1,12	----
5	3,05	1,61	0,48	----
6	2,59	1,19		----
7	2,16	----	0,14	----
8	1,68	----	----	----
9	1,21	----	----	----

**Tabela H.3** - Concentração de açúcares ao longo do processo de desacidificação num fermentador de leite fixo com reciclo total a 15°C para estudar o efeito da carga de ProMalic®.

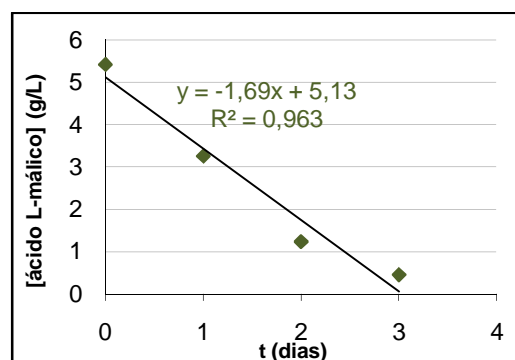
t (dias)	[açúcares] (g/L)			
	1 g/L ProMalic	2 g/L ProMalic	5 g/L ProMalic	10 g/L ProMalic
0	217,0	195,0	195,5	183,0
1	----	207,0	202,5	186,0
2	----	----	----	181,0
3	----	----	192,5	176,0
4	----	----	----	----
5	212,0	183,0	164,5	----
6	----	177,0	----	----
7	----	----	149,5	----
8	----	----	----	----
9	171,5	----	----	----



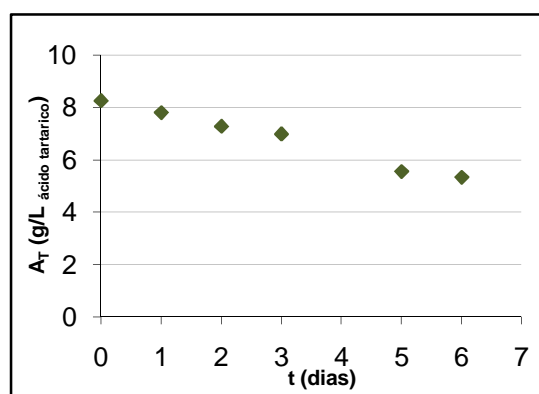
**Figura H.2** – Perfil de concentração de ácido L-málico no fermentador de leite fixo com reciclo total ao longo do tempo e respectiva linearização para uma carga de 2 g/L de ProMalic® a 15°C.



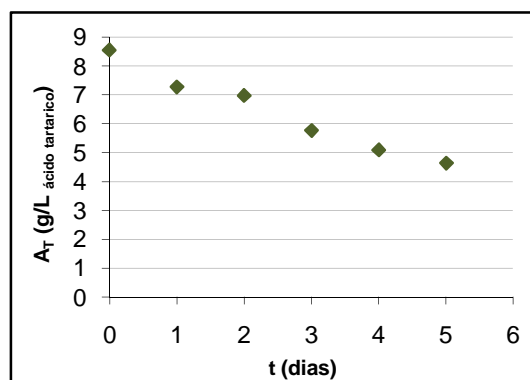
**Figura H.3** – Perfil de concentração de ácido L-málico no fermentador de leito fixo com reciclo total ao longo do tempo e respectiva linearização para uma carga de 5 g/L de ProMalic® a 15°C (entrada do fermentador (◆); saída do fermentador (□)).



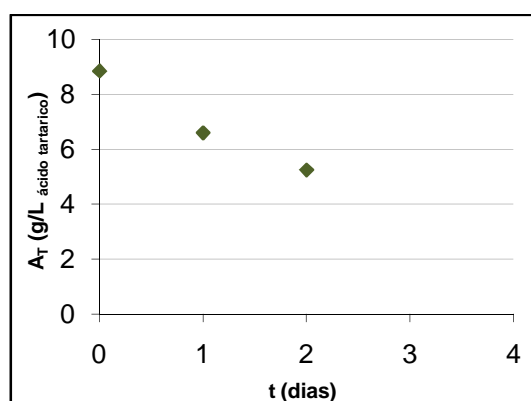
**Figura H.4** – Perfil de concentração de ácido L-málico no fermentador de leito fixo com reciclo total ao longo do tempo e respectiva linearização para uma carga de 10 g/L de ProMalic® a 15°C.



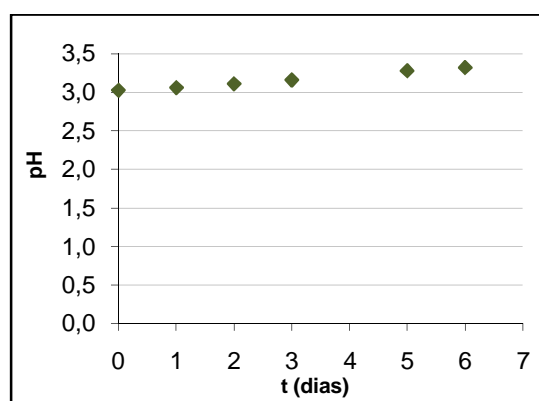
**Figura H.5** – Variação da acidez total no fermentador de leito fixo com reciclo total ao longo do tempo para uma carga de 2 g/L de ProMalic® a 15°C.



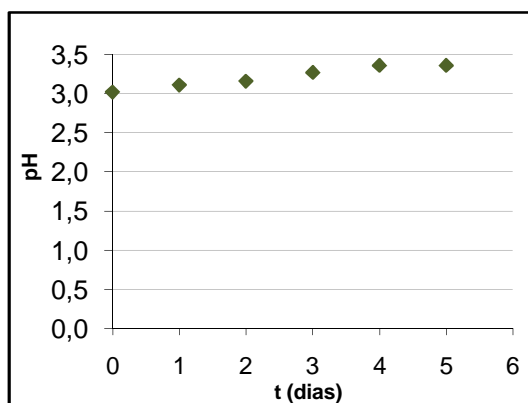
**Figura H.6** – Variação da acidez total no fermentador de leito fixo com reciclo total ao longo do tempo para uma carga de 5 g/L de ProMalic® a 15°C.



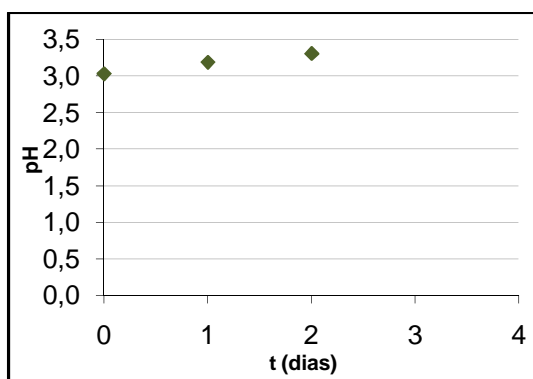
**Figura H.7** – Variação da acidez total no fermentador de leito fixo com reciclo total ao longo do tempo para uma carga de 10 g/L de ProMalic® a 15°C.



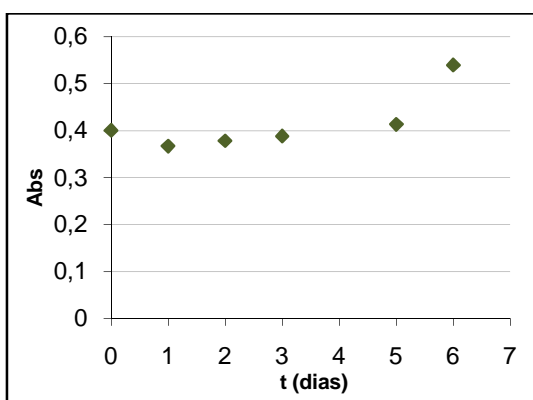
**Figura H.8** – Variação do pH no fermentador de leito fixo com reciclo total ao longo do tempo para uma carga de 2 g/L de ProMalic® a 15°C.



**Figura H.9** – Variação do pH no fermentador de leito fixo com reciclo total ao longo do tempo para uma carga de 5 g/L de ProMalic® a 15°C.

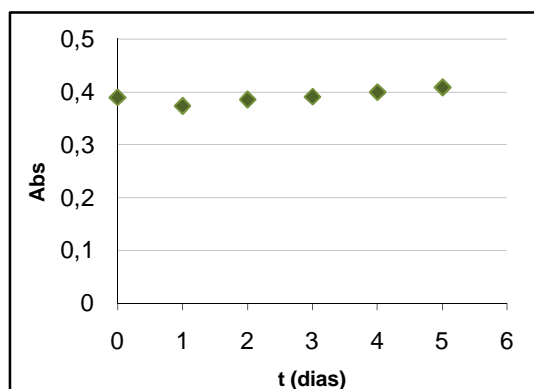


**Figura H.10** – Variação do pH no fermentador de leito fixo com reciclo total ao longo do tempo para uma carga de 10 g/L de ProMalic® a 15°C.

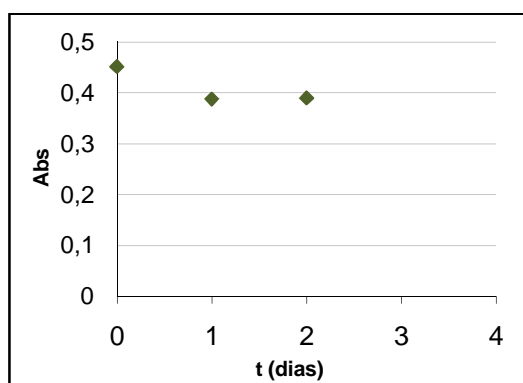


**Figura H.11** – Variação da absorvância a 400 nm no fermentador de leito fixo com reciclo total ao longo do tempo, para uma carga de 2 g/L de ProMalic® a 15°C.

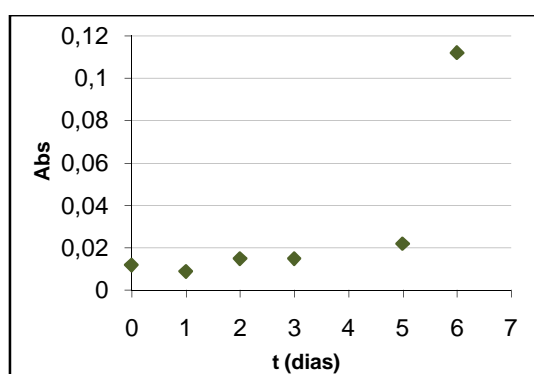




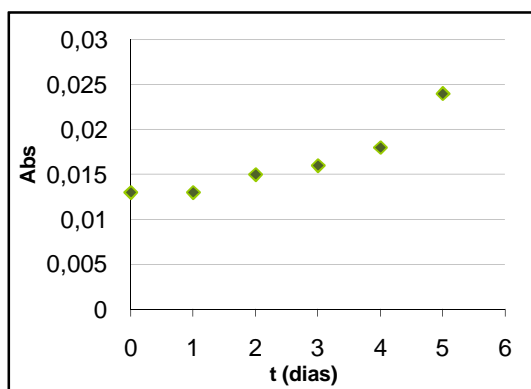
**Figura H.12** – Variação da absorvância a 400 nm no fermentador de leito fixo com reciclo total ao longo do tempo para uma carga de 5 g/L de ProMalic® a 15°C.



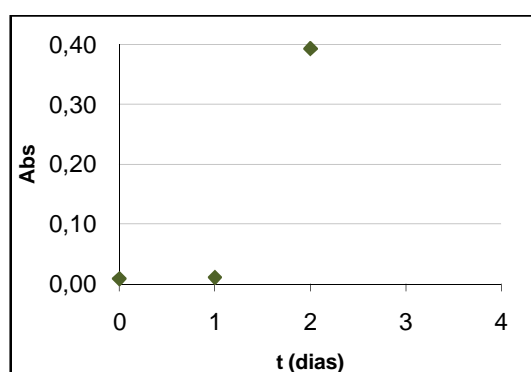
**Figura H.13** – Variação da absorvância a 400 nm no fermentador de leito fixo com reciclo total ao longo do tempo para uma carga de 10 g/L de ProMalic® a 15°C.



**Figura H.14** – Variação da absorvância a 620 nm no fermentador de leito fixo com reciclo total ao longo do tempo para uma carga de 2 g/L de ProMalic® a 15°C.



**Figura H.15** – Variação da absorvância a 620 nm no fermentador de leito fixo com reciclo total ao longo do tempo para uma carga de 5 g/L de ProMalic® a 15°C.



**Figura H.16** – Variação da absorvância a 620 nm no fermentador de leito fixo com reciclo total ao longo do tempo para uma carga de 10 g/L de ProMalic® a 15°C.

**Tabela H.4** – Concentração de anidrido sulfuroso no final do ensaio realizado com diferentes cargas de ProMalic® a 15°C.

[ácido L-málico] <sub>previsto</sub> ( mg/L)	Método de Ripper simples		Método de Ripper duplo	
	[SO <sub>2</sub> ] <sub>livre</sub> (mg/L)	[SO <sub>2</sub> ] <sub>livre</sub> (mg/L)	[SO <sub>2</sub> ] <sub>livre</sub> (mg/L)	[SO <sub>2</sub> ] <sub>total</sub> (mg/L)
2	0,00	76,80	6,40	140,80
5	0,00	69,12	6,40	128,00
10	3,20	69,12	6,40	131,20

**Anexo I - Influência do caudal de recirculação no processo de desacidificação num fermentador de leito fixo com reciclo total.**

**Tabela I.1** – Concentração de anidrido sulfuroso no início do ensaio realizado com um caudal de recirculação de 257 cm<sup>3</sup>/min a 15°C.

Q(cm <sup>3</sup> /min)	Método de Ripper simples		Método de Ripper duplo	
	[SO <sub>2</sub> ] <sub>livre</sub> (mg/L)	[SO <sub>2</sub> ] <sub>livre</sub> (mg/L)	[SO <sub>2</sub> ] <sub>livre</sub> (mg/L)	[SO <sub>2</sub> ] <sub>total</sub> (mg/L)
257	16,00	112,64	19,20	147,20

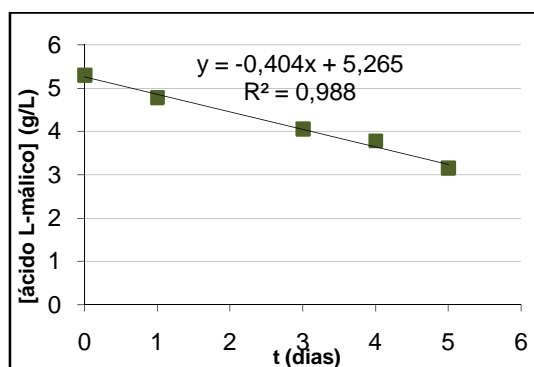
**Tabela I.2** - Concentração de ácido L-málico ao longo do processo de desacidificação num fermentador de leito fixo com reciclo total a 15°C para estudar o efeito do caudal de recirculação.

t (dias)	[ácido L-málico] (g/L)	
	100 mL/min	257 mL/min
0	5,28	5,30
1	----	4,78
2	4,44	----
3	----	4,06
4	----	3,78
5	3,05	3,15
6	2,59	----
7	2,16	----
8	1,68	----
9	1,21	----

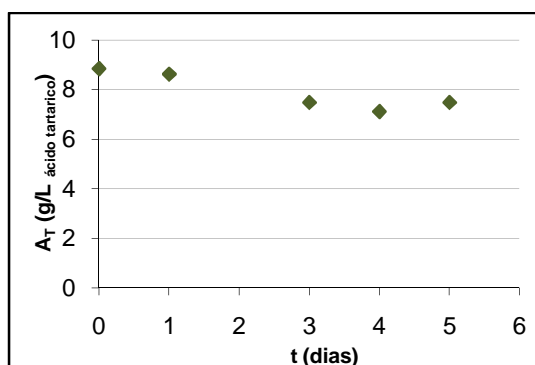
**Tabela I.3** - Concentração de açúcares ao longo do processo de desacidificação num fermentador de leito fixo com reciclo total a 15°C para estudar o efeito do caudal de recirculação.

t (dias)	[açúcares] (g/L)	
	100 mL/min	257 mL/min
0	217,0	201,0
1	----	198,5
2	----	----
3	----	----

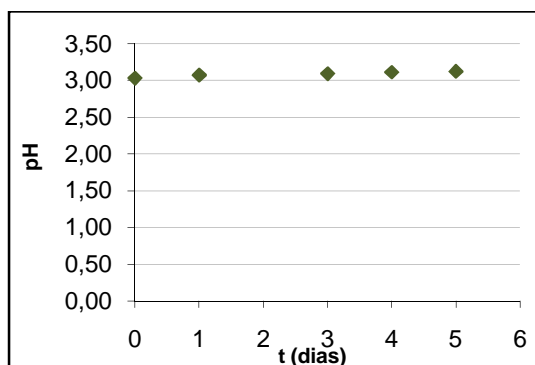
4	----	194,5
5	212,0	194,0
9	171,5	----



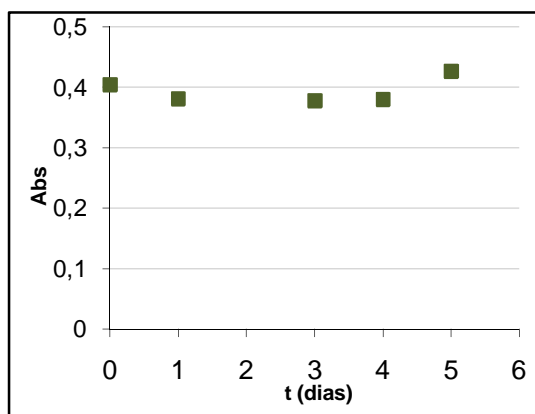
**Figura I.1** – Perfil de concentração de ácido L-málico ao longo do tempo e respectiva linearização para um caudal de recirculação de 257 cm<sup>3</sup>/min a 15°C.



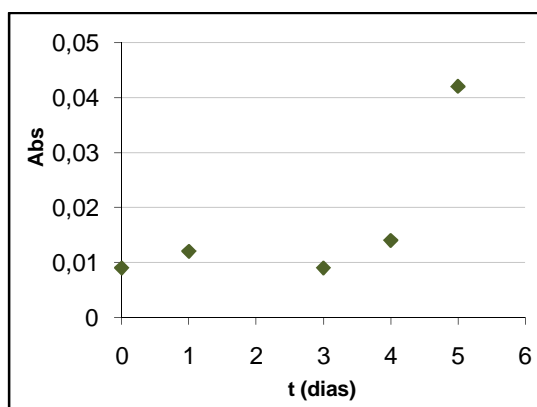
**Figura I.2** – Variação da acidez total ao longo do tempo para um caudal de recirculação de 257 cm<sup>3</sup>/min a 15°C.



**Figura I.3** – Variação do pH ao longo do tempo para um caudal de recirculação de 257 cm<sup>3</sup>/min a 15°C.



**Figura I.4** – Variação da absorvância a 400 nm ao longo do tempo para um caudal de recirculação de 257 cm<sup>3</sup>/min a 15°C.



**Figura I.5** – Variação da absorvância a 620 nm ao longo do tempo para um caudal de recirculação de 257 cm<sup>3</sup>/min a 15°C.

**Tabela I.4** – Concentração de anidrido sulfuroso no final do ensaio realizado com um caudal de recirculação de 257cm<sup>3</sup>/min a 15°C.

Q (cm <sup>3</sup> /min)	Método de Ripper simples		Método de Ripper duplo	
	[SO <sub>2</sub> ] <sub>livre</sub> (mg/L)	[SO <sub>2</sub> ] <sub>livre</sub> (mg/L)	[SO <sub>2</sub> ] <sub>livre</sub> (mg/L)	[SO <sub>2</sub> ] <sub>total</sub> (mg/L)
257	0,00	58,88	6,40	105,60

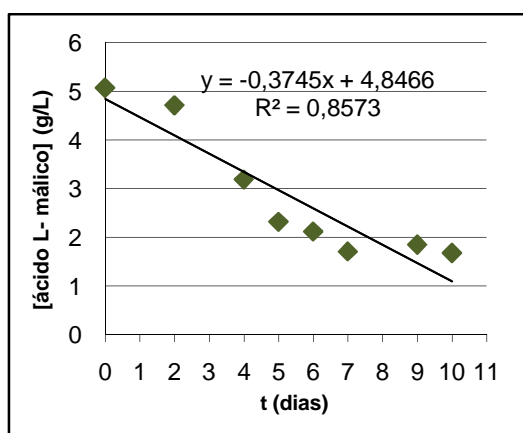
## Anexo J - Influência da levedura *Saccharomyces cerevisiae* no processo de desacidificação num fermentador de leito fixo com reciclo total.

**Tabela J.1** – Concentração de anidrido sulfuroso no início do ensaio realizado para avaliar a influência da *Saccharomyces cerevisiae* no processo de desacidificação realizado pela levedura *Schizosaccharomyces pombe* imobilizada a 15°C.

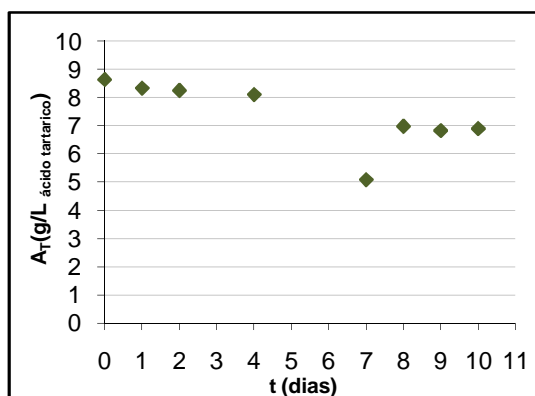
Ensaio	Método de Ripper simples		Método de Ripper duplo	
	[SO <sub>2</sub> ] <sub>livre</sub> (mg/L)	[SO <sub>2</sub> ] <sub>livre</sub> (mg/L)	[SO <sub>2</sub> ] <sub>livre</sub> (mg/L)	[SO <sub>2</sub> ] <sub>total</sub> (mg/L)
	9,60	75,52	22,40	176,00

**Tabela J.2** - Concentração de ácido L-málico ao longo do processo de desacidificação num fermentador de leito fixo com reciclo total a 15°C para estudar o efeito da presença da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

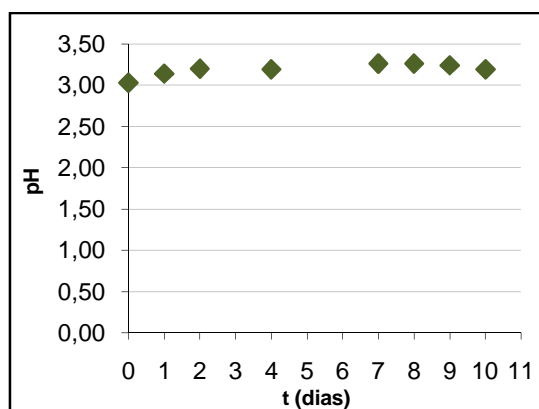
t (dias)	[ácido L-málico] (g/L)	[açúcares] (g/L)
0	5,08	195,5
2	4,72	182,0
4	3,19	184,8
5	2,32	41,7
6	2,12	6,6
7	1,71	0,06
9	1,85	0,09
10	1,68	0,12



**Figura J.1** – Perfil da concentração de ácido L-málico ao longo do tempo e respectiva linearização para um caudal de recirculação de 150 cm<sup>3</sup>/min a 15°C.



**Figura J.2** – Variação da acidez total ao longo do tempo para um caudal de recirculação de 150 cm<sup>3</sup>/min a 15°C.



**Figura J.3** – Variação do pH ao longo do tempo para um caudal de recirculação de 150 cm<sup>3</sup>/min a 15°C.

**Tabela J.3** – Concentração de anidrido sulfuroso no final do ensaio realizado para avaliar a influência da *Saccharomyces cerevisiae* no processo de desacidificação realizado pela levedura *Schizosaccharomyces pombe* imobilizada a 15°C.

Ensaio	Método de Ripper simples		Método de Ripper duplo	
	[SO <sub>2</sub> ] <sub>livre</sub> (mg/L)	[SO <sub>2</sub> ] <sub>livre</sub> (mg/L)	[SO <sub>2</sub> ] <sub>livre</sub> (mg/L)	[SO <sub>2</sub> ] <sub>total</sub> (mg/L)
	0,00	67,84	16,00	150,40